

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

MULTIFUNCIONALIDAD DE LA ADENOSINA DESAMINASA
DE LA SUPERFICIE CELULAR Y DE SUS PROTEÍNAS DE
UNIÓN

SILVIA GINÉS PADRÓS

1. 4. 1. CARACTERISTICAS GENERALES Y CLASIFICACIÓN.

La dopamina es la principal catecolamina que actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central de los mamíferos donde controla una gran variedad de funciones incluyendo la actividad locomotora, la respuesta cognitiva, la respuesta emocional, la ingesta y la regulación endocrina. La dopamina, también ejerce múltiples funciones en el sistema periférico como modulador de la liberación de catecolaminas, la secreción hormonal, el tono cardiovascular, la función renal y la motilidad gastrointestinal (Missale et al, 1998).

El sistema dopaminérgico ha sido objeto de gran interés durante los últimos años por la relación existente entre una desregulación de la transmisión dopaminérgica y algunas situaciones patológicas tales como el Parkinson, la esquizofrenia, el síndrome de Tourette y la hiperprolactinemia (Missale et al, 1998; Richardson et al, 1997; Kanda et al, 1998). La diversidad funcional de la dopamina es reflejo de la heterogeneidad de los receptores de dopamina existentes (Figura 15).

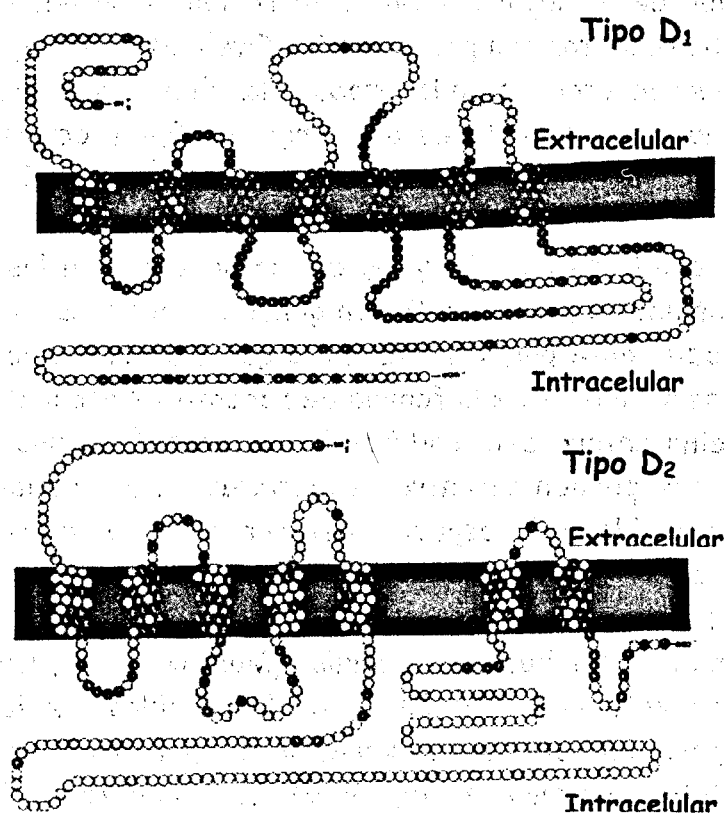


Figura 15. Secuencia aminoacídica de los dos subtipos de receptores de dopamina.

Estos receptores pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G. En 1978, se propuso por primera vez, en base a evidencias farmacológicas y bioquímicas, la clasificación de los receptores de dopamina en dos grupos distintos: unos acoplados positivamente a adenilato ciclasa y otros independientes del sistema generador de AMPc. (Spano et al, 1978). En 1979 Keabian and Calne, sugirieron denominar D₁ a los receptores que estimulan la adenilato ciclasa y D₂ aquellos que la inhiben. Estudios posteriores, confirmaron esta clasificación al presentar ambos receptores diferencias farmacológicas, fisiológicas, bioquímicas y de distribución. Así, mediante técnicas de clonaje (Gingrich and Caron, 1993; O'Dowd, 1993), se han caracterizado hasta el momento cinco receptores de dopamina genéticamente distintos que se han clasificado atendiendo a sus características farmacológicas y bioquímicas en dos grandes subfamilias: los receptores tipo D₁ que comprenden los receptores D₁ y D₅ y los receptores tipo D₂ representados por los receptores D₂, D₃ y D₄. Los receptores tipo D₁ median la acción de la dopamina vía estimulación de la adenilato ciclasa por acoplamiento del receptor con proteínas G_s (Civelli et al, 1993), mientras que la activación de los receptores tipo D₂ produce la inhibición de la adenilato ciclasa al estar acoplados los receptores a la proteína G_{i/o} y activan canales de K⁺ (Bunzow et al, 1988; Dal Toso et al, 1989; Todd et al, 1989; Sunahara et al, 1990, 1991).

Los genes que codifican para D₁ y D₅, de forma similar a los genes de otros receptores acoplados a proteínas G, son genes sin intrones. La interrupción de la secuencia codificante por intrones es lo que distingue a los receptores de tipo D₂ de otros miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, donde la proteína entera está codificada por un exón. Como resultado de un splicing alternativo pueden encontrarse distintas formas de los receptores D₂ y D₃ según el tejido y la especie. Así por ejemplo, el receptor D₂ está codificado por dos mRNA resultado de un splicing alternativo, lo que da lugar a una forma corta D_s y una forma larga D_L, esta última con una inserción de 29 aminoácidos en el tercer bucle intracelular (Monsman et al, 1989). El mRNA de las dos formas está presente en todos los tejidos donde se expresa el receptor D₂, pero, en general, la expresión de la forma corta es menor (Dal Toso et al, 1989; Monsman et al, 1989). Los receptores D₄ presentan un elevado polimorfismo (Missale et al, 1998).

Los receptores D₂ y D₃, aunque desde un punto de vista genético y estructural son muy similares, son perfectamente distinguibles farmacológicamente

mediante el uso de agonistas y antagonistas selectivos; por ejemplo, la dopamina es 20 veces más potente para el D₃ que para el D₂ (O'Dowd et al, 1993). Todos los receptores de dopamina, presentan una elevada homología en sus dominios transmembrana así como un elevado grado de conservación en aquellos residuos que son clave para la unión de catecolaminas, por ejemplo, dos serinas en el quinto dominio transmembrana que están implicadas en el reconocimiento de dos grupos hidroxilos de las catecolaminas (Strader et al, 1988, 1989). Por el contrario estos receptores muestran diferencias en los sitios diana de modificaciones post-traduccionales (Figura 16).

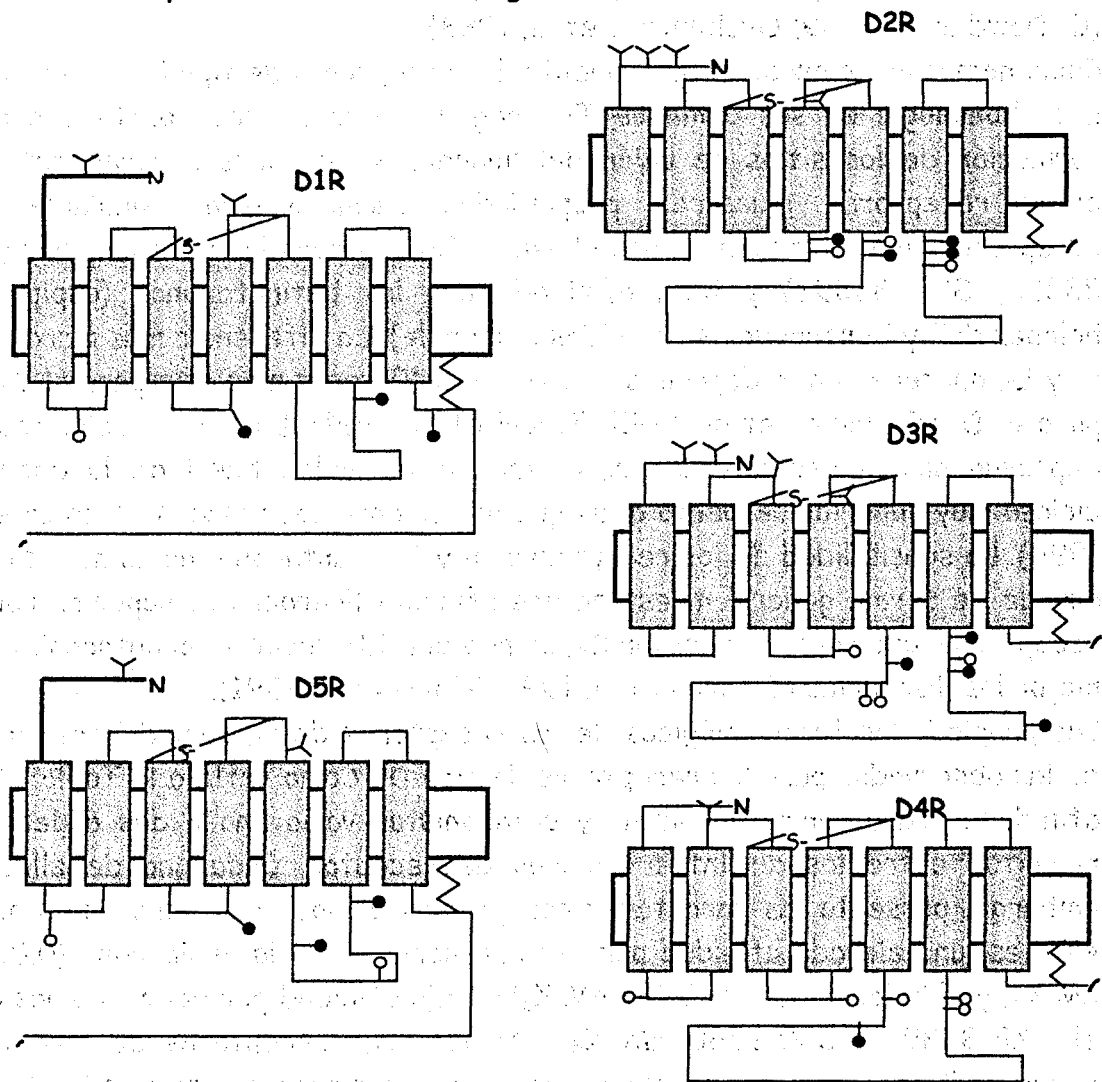


Figura 16. Comparación de las características estructurales de los receptores de dopamina. Fosforilación por PKA \blacktriangle . Fosforilación por PKC \bullet . Palmitoilación \curvearrowright . Glicosilación γ .

Cada subtipo de receptor, presenta sitios consenso de N-glicosilación. Los receptores D₁ y D₅ presentan dos sitios de glicosilación en el dominio amino-terminal y en el segundo bucle extracelular (EL₂). Los receptores D₂ y D₃ pueden presentar múltiples sitios de glicosilación en sus dominios extracelulares, por el contrario el receptor D₄ sólo presenta un sitio de glicosilación. También en los dominios extracelulares (EL₁ y EL₂) se encuentran dos residuos de cisteína que podrían establecer puentes disulfuro (Fraser 1989, Dohlman et al, 1990). Otro residuo de cisteína está localizado en una región próxima a la cola carboxi-terminal que como en otros receptores (el receptor de rodopsina y el receptor β-adrenérgico), puede palmitoilarse (O'Dowd et al, 1989; Ovchinnikov et al, 1988).

Como hemos mencionado anteriormente, los receptores de tipo D₁ muestran una gran homología en sus dominios TM, regiones que se cree participan en la formación de los sitios de unión del ligando. No es pues sorprendente que estos receptores muestren propiedades farmacológicas similares. Los receptores tipo D₁ presentan una elevada afinidad para las benzazepinas (SCH 23390, SKF 38393) y baja afinidad para las butirofenonas (espiperona, haloperidol) y benzamidas sustituidas (sulpiride). La diferencia más clara entre D₁ y D₅ aparece con la dopamina, siendo ésta 10 veces más afín para el D₅ que para el D₁ (Surmeier et al, 1995; Tiberi et al, 1991). Las líneas celulares que expresan ambos receptores, presentan una actividad basal de la adenilato ciclasa muy superior respecto a las que únicamente expresan D₁. (Tiberi et al, 1994). La sensibilidad de los receptores D₁ y D₅ a antagonistas es muy similar, aunque de forma general muestran una afinidad ligeramente superior para el receptor D₁ que para el receptor D₅, siendo el (+)-butaclamol el antagonista que mejor los discrimina (Seeman et al, 1994; Tiberi et al, 1991).

Las propiedades farmacológicas de los receptores de tipo D₂ difieren mucho de las observadas para los receptores de tipo D₁. Como refleja la Tabla VI, las afinidades para varios agonistas y antagonistas varía uno o dos órdenes de magnitud entre los distintos subtipos de receptor. Cada uno de ellos, sin embargo, presenta las características propias de los receptores de tipo D₂, esto es, una elevada afinidad por butirofenonas como la espiperona (0.03-0.6 nM K_d) y el haloperidol (0.45-9.8 nM K_d) y baja afinidad por benzazepinas como el SKF-38393 (1800-9560 nM K_d). De los tres receptores de tipo D₂ el receptor D₄ es el que farmacológicamente puede diferenciarse más fácilmente. En general, el receptor D₄ presenta baja afinidad para la mayor parte de antagonistas dopaminérgicos. Por ejemplo, los receptores D₂ y D₃ presentan elevada afinidad para benzamidas como el raclopride, mientras que el receptor

D₄ sorprendentemente presenta una baja afinidad para este componente (de 30 a 165 veces inferior). Sin embargo, el receptor D₄ presenta una elevada afinidad para el neuroléptico atípico clozapina, unas 6-20 veces superior a la manifestada por los receptores D₂ y D₃.

	D ₁	D ₅	
Butaclamol	0.9-3.0	5.5-27	antagonista
Clozapine	141	250-336	agonista
SCH2330	0.11-0.66	0.3-0.54	antagonista
SCH2338	15-41	350-450	antagonista
cis-Flupenthixol	1.6-5.6	6.3-70	agonista
Haloperidol	27-203	48-151	agonista
Siperone	220	4500	agonista
Sulpiride	20.4	11.0-29.0	agonista
Ketanserin	190	330-2500	antagonista

ANTAGONISTA

Butaclamol	0.9-3.0	5.5-27	antagonista
Clozapine	141	250-336	agonista
SCH2330	0.11-0.66	0.3-0.54	antagonista
SCH2338	15-41	350-450	antagonista
cis-Flupenthixol	1.6-5.6	6.3-70	agonista
Haloperidol	27-203	48-151	agonista
Siperone	220	4500	agonista
Sulpiride	20.4	11.0-29.0	agonista
Ketanserin	190	330-2500	antagonista

AGONISTAS

SKF-38393	87-150	43-100-	
Apomorfina	210-680	152-363	
dopamina	2300-12	228-235	
fenoldopan	17-28	15	
NPA	1540-1816	1130	

Tabla VIa. Agonistas y antagonistas de los receptores tipo D₁. La tabla muestra las K_D (nM) comparadas del receptor D₁ y el receptor D₅. En algunos casos se muestra el valor de la K_D para el estado de alta y baja afinidad.

Tabla VIa. Antagonistas de los receptores tipo D₂, D₃ y D₄. La tabla muestra las K_D (nM) comparadas del receptor D₂, el receptor D₃ y el receptor D₄. ND significa que para este componente no hay valores de K_D para el receptor considerado. En algunos casos se muestra el valor de la K_D para el estado de alta y baja afinidad

ANTAGONISTAS	D ₂	D ₃	D ₄
Butaclamol	0.8	ND	40
Clozapine	56-138	180	9
Haloperidol	0.45-1.0	9.8	5.1
Spiiperone	0.03-0.07	0.6	0.08
Racloride	1.8-10.5	3.5	237
Sulpiride	4.8-46	25	52
Pimozide	2.4	3.7	43

AGONISTAS	D ₂	D ₃	D ₄
SKF38393	9560	5000	1800
Apomorfina	24.0	20	4.1
Bromocriptina	5.3-12.6	7.4	340
Dopamina (high)	2.8-474	25	28
Dopamina (low)	1705-2490	27	450
Quinpirole	576	5.1	46

Tabla VIb. Agonistas y antagonistas de los receptores tipo D₂. La tabla muestra las K_D (nM) comparadas del receptor D₂, el receptor D₃ y el receptor D₄. ND significa que para este componente no hay valores de K_D para el receptor considerado. En algunos casos se muestra el valor de la K_D para el estado de alta y baja afinidad

La existencia de múltiples subtipos de receptores de dopamina, sugiere una diversidad en su función fisiológica que podría explicarse atendiendo a:

- El hecho de que diferentes receptores de dopamina puedan estar acoplados a distintos segundos mensajeros (Adenilato ciclasa, canales de Ca⁺⁺, canales de K⁺...) permite una gran diversidad de respuesta ante una sola sustancia, la dopamina.

- La distinta afinidad que manifiestan los distintos subtipos de receptores por la dopamina podría permitir la activación de unos receptores y no otros, atendiendo a la cantidad de dopamina liberada.
- Los distintos subtipos podrían conferir más flexibilidad y variación en la expresión durante el desarrollo o la maduración del cerebro. Cada subtipo de receptor, se encuentra, presumiblemente, bajo el control de un único elemento promotor, que difiere en términos de su expresión tisular y en la función de la respuesta a determinados factores de transcripción como los receptores de hormonas esteroideas, *enhancer* o proteínas de unión de elementos de respuesta a AMPc.

El estudio de los receptores de dopamina y su papel en la regulación de la actividad neuronal y en la conducta, así como el desarrollo de fármacos que actúan sobre ellos, constituyen temas de gran importancia en el campo de la neurofarmacología.

1. 4. 2. RECEPTORES DE TIPO D₁

El primer receptor de tipo D₁ funcional (denominado receptor D₁ o D_{1A}) fue clonado en humanos simultáneamente por distintos grupos de investigación (Deary et al, 1990; Monsma et al, 1990; Sunahara et al, 1990; Zhou et al, 1990).

1. 4. 2. 1. Caracterización molecular y distribución de los receptores de tipo D₁.

El primer receptor tipo D₁ funcional (denominado receptor D₁ o D_{1A}) fue clonado en humanos simultáneamente por distintos grupos de investigación (Deary et al, 1990; Monsma et al, 1990; Sunahara et al, 1990; Zhou et al, 1990). Este receptor es una proteína de 446 aminoácidos, con una identidad en los dominios transmembrana del 44 % respecto al receptor D₂ anteriormente clonado y sólo del 29 % si se considera la proteína entera (Figura 15). El segundo miembro de esta familia también fue clonado en humanos simultáneamente en distintos laboratorios, denominándolo receptor D₅, D_{1B} o D_{1β}, (Grandy et al, 1991; Sunahara et al, 1991; Tiberi et al, 1991; Weinshank et al, 1991).

Los genes que codifican para ambos receptores son genes sin intrones, una característica común a los receptores acoplados a proteínas G (Dohlman et al, 1987). El gen que codifica para el receptor D₁ está localizado en el cromosoma 5 (Sunahara et al, 1990), cromosoma en el que también se localizan varios genes que codifican para otros receptores de catecolaminas (Yang-Feng et al, 1990) mientras que el gen que codifica para el receptor D₅ está localizado en el cromosoma 4.

Un descubrimiento interesante en el clonaje de los receptores de tipo D₁ fue la identificación de pseudogenes para el receptor D₅ humano (Grandy et al, 1991; Jarvie et al, 1991; Weinshank et al, 1991). Existen dos pseudogenes con

una homología de secuencia del 98% entre ellos y de un 95% con el receptor D₅ humano. Su carácter de pseudogenes se deduce por la gran cantidad de codones stop en su secuencia que producirían proteínas truncadas y presumiblemente receptores no funcionales (Grandy et al, 1991).

Una de las diferencias más relevantes entre los dos miembros de receptores tipo D₁ es su patrón de expresión en el sistema nervioso central. El mRNA del receptor D₁ (4.2 kb en humanos y en rata) es mucho más abundante y está más ampliamente distribuido que el del receptor D₅ (Fremeau et al, 1991; Sunahara et al, 1991; Tiberi et al, 1991; Weiner et al, 1991). La mayor expresión de D₁ se encuentra en aquellas áreas del cerebro tradicionalmente asociadas a funciones dopaminérgicas, como el caudado-putamen, el núcleo accumbens y los tubérculos olfativos. También se encuentra mRNA que codifica para el receptor D₁ en córtex cerebral, sistema límbico, hipotálamo y tálamo. Un hecho importante es que no se ha detectado mRNA en la sustancia nigra, pars reticulata, núcleo entopeduncular, globus pallidus y el núcleo subtalámico, áreas que, sin embargo, presentan numerosos sitios de unión de dopamina con características de D₁. Este hecho podría explicarse si el receptor D₁ se sintetizara en el estriado y fuera posteriormente translocado a estas regiones como sugieren Gale et al, 1977. En contraste con la amplia distribución del receptor D₁, el mRNA para el receptor D₅ (3.0-3.7 kb en rata y humano) presenta una distribución mucho más restringida. Así en el SNC de rata la expresión de mRNA se produce tan sólo en las estructuras límbicas (Tiberi et al, 1991). No se ha encontrado expresión apreciable de mRNA en estriado, núcleo accumbens y tubérculos olfativos, las principales estructuras que expresan el receptor D₁.

En algunos tejidos periféricos, se han clonado los mismos receptores presentes en el SNC. Se ha demostrado que todos los subtipos de receptores de dopamina clonados, están presentes en el riñón y que el receptor D₄ está también presente en el corazón (Gesek et al, 1991; Matsumoto et al, 1995; Nash et al, 1993; Sokoloff et al, 1990, Yamaguchi et al, 1993). A finales de la década de los 70 mediante el uso de radioligandos, se tuvieron evidencias de la presencia del receptor D₂ en el lóbulo anterior e intermedio de la glándula pituitaria (Bernard et al, 1991, Caron et al, 1978, Munemura et al, 1980). En la Tabla VII se resume la distribución y función de los receptores de dopamina periféricos.

En algunos tejidos periféricos, se han clonado los mismos receptores presentes en el SNC. Se ha demostrado que todos los subtipos de receptores de dopamina clonados, están presentes en el riñón y que el receptor D₄ está también presente en el corazón (Gesek et al, 1991; Matsumoto et al, 1995; Nash et al, 1993; Sokoloff et al, 1990, Yamaguchi et al, 1993). A finales de la década de los 70 mediante el uso de radioligandos, se tuvieron evidencias de la presencia del receptor D₂ en el lóbulo anterior e intermedio de la glándula pituitaria (Bernard et al, 1991, Caron et al, 1978, Munemura et al, 1980). En la Tabla VII se resume la distribución y función de los receptores de dopamina periféricos.

TEJIDO	EFEECTO FISIOLÓGICO	RECEPTOR
Vasos sanguíneos		
Adventicia	Inhibición de la liberación de NE	Tipo D ₂
Media	Vasodilatación	Tipo D ₂
Intima	??	Tipo D ₂
Glándula adrenal		
Glomerulosa	??	Tipo D ₁
Médula	Inhibición de la secreción de aldosterona	Tipo D _{2e}
	Estimulación liberación NE/E	Tipo D ₁
	Inhibición liberación NE/E	Tipo D ₂
Riñón		
Glomérulo	Incrementa el flujo de filtración	Tipo D ₁
Aparato juxtaglomerular	Estimulación secreción de renina	Tipo D ₁
Túbulo proximal	Inhibición reabsorción de Na ⁺	Tipo D ₁
Zona ascendente del asa de Henle	Inhibición reabsorción de Na ⁺	Tipo D ₁
Conducto colector	Inhibición reabsorción de Na ⁺	Tipo D ₁
	Inhibición acción de la vasopresina	Tipo D ₂
	Inhibición liberación NE	Tipo D ₂
Corazón	??	D ₄

Tabla VII. Distribución y función de los receptores periféricos de dopamina

1. 4. 2. 2. Transducción de la señal de los receptores tipo D₁.

Inicialmente, la transducción de la señal asociada a la activación de los receptores de dopamina, se había estudiado en preparaciones crudas de cerebro o usando receptores purificados reconstituidos. Sin embargo, a partir

del clonaje de los distintos subtipos de receptores de dopamina, el acoplamiento a distintos sistemas efectores se ha estudiado en líneas transfectadas con cada uno de los cDNA de los receptores dopaminérgicos. Esta aproximación tiene la ventaja de poder trabajar con poblaciones puras de un tipo u otro de receptor pero tienen el inconveniente de ser un sistema artificial que puede proporcionar resultados no extrapolables directamente a condiciones "in vivo".

A principios de los 70, se demostró que los receptores de dopamina podían modular la actividad de la adenilato ciclasa (AC). La estimulación por agonistas del receptor D₁ producía la estimulación de la AC en muchas regiones dopaminérgicas del cerebro, como el núcleo accumbens y los tubérculos olfativos. Después del clonaje del receptor D₁ en 1990, se estudió el sistema efector de dicho receptor en células transfectadas. En una amplia variedad de líneas celulares se demostró que la activación de los receptores D₁ de dopamina claramente estimulaba la acumulación de AMPc (Monsma et al, 1989, Zhou et al, 1990). El clonaje del segundo receptor tipo D₁, el receptor D₅, permitió establecer que también estimula a la AC como predecía su similitud estructural con el receptor D₁ (Grandy et al, 1989, Sunahara et al, 1991, Tiberi et al, 1991, Weinschank et al, 1991).

La activación de la AC vía receptores tipo D₁ se asume que está mediada por la subunidad G_sα de las proteínas G. Sin embargo, se ha demostrado que la subunidad G_{olf}α, que también estimula la AC, se expresa en caudado, núcleo accumbens y tubérculos olfativos y que en estos tejidos es más abundante que la subunidad G_sα (Duche et al, 1976) por lo que no se puede descartar la participación de esta proteína G en la señalización.

Los receptores tipo D₁ pueden también acoplarse a proteínas G distintas de la subunidad G_sα. Concretamente, los receptores D₁ estriatales parecen estar acoplados a proteínas G_iα cuando se reconstituyen en vesículas de fosfolípidos (Sidhu et al, 1991). Además, la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra distintos subtipos de proteínas G ponen de manifiesto que el receptor D₁ coinmunoprecipita con G_oα (Kimura et al, 1995) y G_qα (Wang et al, 1995) lo que sugiere que el receptor D₁ está asociado al metabolismo de los fosfoinositoles (Wang et al, 1995, Yu et al, 1996). De acuerdo con esta hipótesis se ha descrito que los receptores D₁ en células Ltk-, estimulan la hidrólisis de fosfatidilinositoles (PI) observándose este efecto a una concentración de dopamina de 1 μM que es el orden de las concentraciones fisiológicas (Liu et al, 1992).

Esta acción de los receptores de dopamina es controvertida ya que si bien agonistas de los receptores tipo D_1 causan incrementos en el metabolismo de los fosfoinositoles en varias regiones del cerebro lo hacen a concentraciones muy altas (Undie et al, 1990, 1994), lo que pone en entredicho la relevancia fisiológica de esta respuesta. Por otro lado algunos autores han demostrado que en células COS-7 estos receptores no pueden estimular el recambio de fosfoinositoles (Demichyshyn et al, 1995; Sugamori et al, 1994, Tiberi et al, 1991). Pedersen et al, 1994 demostraron que, ni el receptor D_1 ni el receptor D_5 , afectaban los niveles de calcio intracelular en CHO (Chinese hamster ovary). Todo ello sugiere que la señalización producida tras la activación de los receptores D_1 depende de la célula en la que se produzca. Es decir, en este caso, y probablemente en muchos otros, la señalización depende del conjunto de proteínas G y otros componentes propios de cada célula.

Los receptores D_1 también afectan la actividad de los canales de calcio. Tanto en las neuronas estriatales de rata como en las células GH_4C_1 , transfectadas con el receptor D_1 , la estimulación del receptor produce incrementos en el flujo de calcio vía los canales de calcio tipo L. En ambos casos, los efectos son mimetizados por análogos del AMPc (Liu et al, 1992; Surmeier et al, 1995) y bloqueados por inhibidores de la PKA, sugiriendo que esta inhibición puede ser el resultado de una fosforilación de los canales de calcio vía PKA.

Los receptores de dopamina también afectan la actividad del intercambiador Na^+/H^+ responsable de la regulación del pH intracelular y del volumen celular.

En vesículas de membrana lumenal de tubuladura renal, los agonistas de los receptores D_1 causan una inhibición en la actividad del intercambiador Na^+/H^+ vía un doble mecanismo dependiente e independiente de AMPc (Felder et al, 1993, 1990). En otros sistemas celulares, sin embargo, parece ser el receptor D_2 de dopamina el responsable de su regulación.

La bomba Na^+-K^+ -ATPasa es esencial para mantener el gradiente electroquímico responsable, entre otras muchas cosas, de la excitabilidad nerviosa. Los receptores de dopamina modulan la actividad de este transportador de iones que, a su vez, regula la absorción en el riñón y la excitabilidad neuronal en el cerebro. Diversos grupos de investigación han sugerido que los efectos de la dopamina en la inhibición de la bomba Na^+-K^+ -ATPasa, están mediados por los receptores D_1 . Otros autores proponen que la regulación de la bomba requeriría la activación simultánea de los receptores D_1 y D_2 de dopamina. (Bertorello et al, 1990, Laitinen et al, 1993, Chien et al, 1993, Shahedi et al, 1995).

En conclusión, los receptores de dopamina modulan la actividad de los canales de calcio, el intercambiador Na^+/H^+ y la bomba Na^+-K^+ -ATPasa.

1. 4. 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN RECEPTOR D₁ DE DOPAMINA EN LA MEMBRANA.

La respuesta celular de los receptores acoplados a proteínas G, inducida por exposición a agonistas, es rápidamente atenuada (Lohsem, 1993). Los mecanismos de la atenuación comprenden la desaparición del agonista del medio extracelular por acción de transportadores específicos o de enzimas degradativas de la membrana y la regulación del propio receptor mediante el proceso de desensibilización. Los mecanismos implicados en la atenuación de la respuesta son muy importantes ya que impiden la sobreestimulación y la lesión de la célula. Se pueden distinguir dos tipos de desensibilización de los receptores, la homóloga y la heteróloga.

La desensibilización homóloga implica una disminución de la funcionalidad del receptor estimulado por la exposición al agonista. A tiempos cortos (de segundos a minutos) el agonista, además de iniciar la señalización, provoca el desacoplamiento del receptor y la proteína G y, por tanto, el fin de la señalización. Este fenómeno inicial puede ir acompañado de la internalización o secuestro del receptor hacia compartimentos intracelulares. La exposición crónica (horas o días) al agonista, puede provocar la pérdida de los receptores de la célula y/o de componentes del sistema de transducción de la señal (*down-regulation*) (Böhm et al, 1997).

La regulación por agonistas de los receptores de catecolaminas es un proceso complicado que implica múltiples mecanismos. Usando como modelo los receptores β -adrenérgicos, se han propuesto dos vías de regulación por el propio ligando para dichos receptores (Jiang et al, 1999). Una de ellas implica la fosforilación del receptor inducida por agonistas vía miembros de la familia de las protein quinasas GRK, lo que conduce a un desacoplamiento funcional del receptor y a la unión del receptor fosforilado a la familia de las arrestinas (mirar apartado 1. 2. 3. 2). La unión del receptor a las arrestinas, provoca un total desacoplamiento del receptor y puede representar el primer paso para su internalización. El segundo mecanismo de regulación implica la fosforilación del receptor vía PKA lo que igualmente produce el desacoplamiento funcional del receptor aunque por un mecanismo que actualmente se desconoce (Jiang et al, 1999)

El papel de la fosforilación inducida por agonistas en la desensibilización de los receptores de dopamina es actualmente objeto de estudio. Recientemente Jiang and Sibley, 1999, mediante mutagénesis dirigida de los aminoácidos diana de fosforilación por PKA, han observado que la desensibilización inducida por agonistas de los receptores mutados está atenuada. Este efecto se observa

cuando se determina la respuesta máxima inducida por la dopamina en la acumulación de AMPc y para que ocurra la atenuación de la desensibilización es importante el residuo de Thr²⁶⁸ del tercer bucle citoplasmático del receptor D₁ de dopamina. Estos datos concuerdan con resultados previos (Neve and Neve, 1997; Robinson and Caron, 1997) en los que también por mutagénesis dirigida y utilizando receptores quimera se había sugerido que las regiones que participan en el acoplamiento con la proteína G_s se encuentran en el tercer bucle citoplasmático de los receptores D₁ de dopamina donde se localiza la Thr²⁶⁸. Sin embargo, aunque la mutación en este residuo atenúa el grado de desensibilización inducida por agonistas, el receptor mutado sigue siendo capaz de desensibilizarse lo que sugiere que la vía de regulación en la que está implicada la fosforilación por quinasas GRK y el sistema de las arrestinas es importante en este proceso (Jiang et al, 1999)

Gordon et al, 1994, han estudiado el efecto de la palmitoilación del receptor D₁ de dopamina en la Cys³⁴⁸ de la cola C-terminal en el proceso de desensibilización. Los autores observaron que el tratamiento con agonistas produce un incremento en la incorporación de [³H] ácido palmítico en el receptor D₁ de dopamina. Sin embargo, aunque este proceso, que ocurre simultáneamente a la fosforilación y desensibilización puede representar un nuevo mecanismo de regulación tal y como ocurre con los receptores β-adrenérgicos (Mouillac et al, 1992) la contribución de esta modificación post-traducciona a la desensibilización del receptor todavía no está clara.

Poco se conoce acerca del proceso de down-regulation del receptor D₁ de dopamina. Mediante técnicas de inmunofluorescencia, Gordon et al, 1994, observaron que tras el tratamiento con dopamina 10 μM durante 15 min, se induce una rápida redistribución del receptor expresado en células Sf9, pasando de una distribución homogénea y difusa a la aparición de agregados del receptor. Cuando las células eran tratadas previamente con el antagonista SCH-23390, se bloquea el efecto de la dopamina. Exposiciones más prolongadas (18 h) a dopamina reducen el marcaje específico en la superficie celular, lo que está de acuerdo con un proceso de secuestro e internalización del receptor que puede ser un paso previo al proceso de *down-regulation*.

La desensibilización heteróloga implica la pérdida de funcionalidad de un receptor inducida por la activación de otro receptor. Es un proceso que se caracteriza por una regulación cruzada o *cross-regulation* entre distintas vías de señalización, de manera que la funcionalidad y la expresión de ciertos receptores y proteínas G se afecta al unirse un agonista a un receptor en principio no relacionado. En la desensibilización heteróloga suelen intervenir

quinasas dependientes de segundos mensajeros, como la PKA o la PKC. Al ser activadas estas quinasas, pueden producir una modulación negativa sobre el propio sistema que las ha activado (desensibilización homóloga) o sobre otros receptores que posean secuencias consenso de fosforilación para dichas quinasas (desensibilización heteróloga). Por ejemplo, la regulación de los niveles de AMPc vía el receptor D₁ de dopamina tiene un papel relevante en el control de la neurotransmisión en el estriado. Fan et al, 1999 han demostrado que la activación del receptor D₁ de dopamina en neuronas estriatales de rata promueve la fosforilación de un tipo de receptor de glutamato, los receptores AMPA (alfa-amino-3hidroxi-5metil-4isoxazol-propionato) potenciando la amplitud de la corriente eléctrica mediada por este receptor. Este efecto se bloquea por antagonistas del receptor D₁ de dopamina y se mimetiza por activadores de la PKA.

1. 5. CODISTRIBUCION E INTERNALIZACION FUNCIONAL ENTRE LOS RECEPTORES DE DOPAMINA Y LOS RECEPTORES DE ADENOSINA EN EL CEREBRO

La adenosina es un nucleósido endógeno que funciona como neuromodulador en el sistema nervioso central. Los receptores A₁ y los A_{2A} son la diana principal de los efectos conductuales que se producen en el animal de experimentación tras la administración de fármacos agonistas o antagonistas adenosínicos (Ferre et al, 1992, 1997; Fredholm, 1995). La cafeína, por ejemplo, es un antagonista de adenosina no selectivo A₁-A_{2A} que actualmente es todavía la sustancia psicótropa más consumida del mundo (Fredholm, 1995). Los receptores A₁ y A_{2A} localizados en los ganglios basales y, en particular, en el estriado, son los responsables de los efectos depresores motrices de agonistas adenosínicos y estimulantes motrices de antagonistas adenosínicos (Ferré et al, 1992, 1997). La mayoría de los receptores adenosínicos estriatales se encuentran localizados en la neurona GABAérgica espinosa mediana, una neurona eferente que constituye más del noventa por ciento de la población neuronal estriatal (Schiffmann et al, 1991; Rivkees et al, 1995). Existen dos subtipos de neuronas GABAérgicas eferentes estriatales, las neuronas estriopalidales, que contienen receptores dopaminérgicos del subtipo D₂, y las

neuronas estriónigro-estriopentapedunculares, que contienen receptores dopaminérgicos D_1 (Ferre et al, 1997). Ambos tipos neuronales contienen receptores A_1 , mientras que los receptores A_{2A} se encuentran solamente en las neuronas estriopalidales (Schiffmann et al, 1991; Ferre et al, 1996). Debido a estas localizaciones anatómicas, los receptores A_{2A} sólo codistribuyen con los receptores dopaminérgicos del tipo D_2 , mientras que los receptores A_1 codistribuyen tanto con los receptores D_2 como con los D_1 . Estos datos proporcionan el marco anatómico que justifica un gran número de resultados experimentales que sugieren que la mayor parte de los efectos motrices de agonistas y antagonistas adenosínicos se producen como consecuencia de la interacción funcional entre subtipos de receptores adenosínicos y dopaminérgicos. En particular, los receptores A_{2A} modulan de forma antagonista los efectos producidos por la estimulación de los receptores D_2 , mientras que los receptores A_1 modulan de forma antagonista al receptor D_1 (Ferre et al, 1991, 1992, 1994, 1997).

Se ha demostrado previamente que las características de unión de un tipo de receptor ligado a proteína G pueden alterarse mediante la estimulación de otro tipo distinto de receptor ligado a proteína G en preparaciones de membranas celulares (Zoli et al, 1993). En preparaciones de membranas de estriado de rata, la estimulación de los receptores A_{2A} disminuye la afinidad de los receptores D_2 para agonistas (Ferre et al, 1991). Por otro lado, la estimulación de los receptores A_1 produce una disminución en la proporción de receptores D_1 en estado de alta afinidad, sin modificar las constantes de disociación de los estados de alta y de baja afinidad del receptor (Ferre et al, 1994). Los receptores A_1 , A_{2A} , D_1 y D_2 están acoplados al enzima adenilato ciclasa, además de a otras vías de transducción de la señal (Fredholm et al, 1994; Missale et al, 1998). La estimulación de los receptores A_{2A} y D_1 (a través de la activación de proteínas G_s) activa, mientras que la estimulación de los receptores A_1 y D_2 (a través de proteínas G_i) inhibe la actividad del enzima adenilato ciclasa. Por ejemplo, en fibroblastos de ratón Ltk^- cotransfectados con los cDNAs de los receptores humanos A_1 y D_1 , el agonista adenosínico CPA disminuye de una forma dosis-dependiente la acumulación de AMPc inducida por dopamina, por el contrario el antagonista del receptor A_1 DPCPX, potencia de forma significativa los niveles basales de AMPc y potencia la acumulación de AMPc inducida por dopamina (Ferre et al, 1998) Así, las interacciones entre los receptores A_1 - D_1 y A_{2A} - D_2 pueden tener lugar a nivel de la formación de segundos mensajeros (como el AMPc) y a otros niveles posteriores (Ferre et al, 1997) aunque no puede excluirse que sean motivadas por la interacción

molecular de ambas proteínas en la membrana (heteromerización de los receptores) a pesar de que hasta el momento esto no ha sido demostrado. La posibilidad de la oligomerización homo o hetero de receptores para explicar los mecanismos de *cross-talk* entre ellos es cada vez una hipótesis más atractiva y motivo de estudio.

Hasta hace poco una de las asunciones más generalizadas sobre los receptores ligados a proteínas *G* era que la relación estequiométrica receptor-proteína *G*-efector es 1:1:1. Estudios sobre la cooperatividad de la unión del agonista al receptor ya sugerían la posibilidad de oligomerización de las proteínas *G* y sus receptores asociados (Willardson et al, 1993). En lo que fue probablemente la primera caracterización inmunológica de receptores acoplados a proteínas *G* en modelos no alterados genéticamente el grupo de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral pudo demostrar la existencia de dímeros de receptor A_1 de adenosina en córtex cerebral de cerdo (Ciruela et al, 1995). Estudios más recientes efectuados con receptores β_2 -adrenérgicos sugieren que el agonista estabiliza la forma dimérica de dicho receptor, la cual parece ser más eficaz funcionalmente que la forma monomérica (Hebert et al, 1996). También se ha encontrado que el receptor dopaminérgico D_2 forma dímeros (Ng et al, 1996) y, recientemente, mediante técnicas de inmunocitoquímica y microscopía confocal nuestro grupo de investigación ha demostrado la agregación de receptores A_1 inducida por el agonista (Franco et al, 1996; Ciruela et al, 1996, 1997; Saura et al, 1998). Los resultados han permitido incluso proponer un modelo de cooperatividad que explicaría desde la unión de ligandos al receptor (cooperatividad negativa) hasta la desensibilización homóloga. Este modelo de cooperatividad se denomina "cluster arranged cooperative model" y supone, como su denominación indica, que el ligando afecta el grado de interacción entre los receptores (Franco et al, 1996). Recientemente en una serie de trabajos (Jones et al, 1998; Kaupmann et al, 1998; White et al, 1998) se demuestra que los subtipos de receptores GABAérgicos GABABR1 y GABABR2 forman heterodímeros, los cuales son requeridos para la formación del receptor GABAB funcional.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

En la última década el grupo de investigación en el que se inscribe esta Tesis Doctoral, se ha interesado de manera preferente en el estudio del papel de la adenosina desaminasa (ADA) de la superficie celular como mediador de la comunicación intra e intercelular.

A mediados de los años noventa, este grupo puso en de manifiesto que el receptor A_1 de adenosina podía actuar como proteína de membrana capaz de anclar la ADA a la superficie celular en membranas de corteza cerebral de cerdo, células DDT₁MF-2 de musculatura lisa de hámster. Ante el hecho sorprendente de la existencia de una interacción molecular entre el receptor A_1 de adenosina y el enzima encargado de degradar el ligando natural del mismo, esto es, la adenosina, se investigó la funcionalidad de esta interacción. Así, se comprobó que la interacción de la ADA de superficie y el receptor A_1 de adenosina favorecía el acoplamiento de éste y la proteína G_i ; o lo que es lo mismo favorecía la existencia de un receptor de alta afinidad permitiendo una correcta transducción de la señal. Esta función de la ADA era además independiente de su actividad catalítica. Por otro lado, en células DDT₁MF-2, la desensibilización del receptor por exposición crónica a agonistas conducía a su fosforilación y a su agregación e internalización de forma conjunta con la ADA. Sin embargo poco o nada se conocía acerca de la naturaleza de las vesículas que dirigían la internalización conjunta de ambas proteínas y de si este fenómeno ocurría en otro tipo de células. Ante este hecho, al inicio de esta Tesis nos planteamos como primer objetivo, comprobar si el receptor A_1 de adenosina podía unir ADA de superficie en células con elevada expresión de ésta y de CD26 (la otra proteína de membrana que se conoce puede actuar de proteína de unión de ADA de superficie) y si este era el caso, abordar el estudio de los mecanismos de endocitosis implicados en la internalización del receptor A_1 de adenosina y la ADA de superficie.

En esta Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto que en células epiteliales de riñón de cerdo, células LLC-PK₁, se produce la interacción molecular entre el receptor A_1 de adenosina y la ADA de superficie. Mediante técnicas de inmunocitoquímica y análisis por microscopía confocal y electrónica y por western blot se ha demostrado la participación de las caveolas en la internalización inducida por R-PIA del receptor A_1 de adenosina así como de la ADA. Este hecho es de gran importancia ya que si bien hasta el momento se conocía la localización de proteínas, entre ellas muchos receptores, en caveolas así como los mecanismos de transducción de señal en los que éstas

participaban, poco se había descrito acerca del secuestro de receptores acoplados a proteína *G* en compartimentos intracelulares que condujeran posteriormente a una degradación (downregulation) y cuya internalización se iniciara en caveolas. Nuestros resultados ayudan a una mayor comprensión de la controvertida función de las caveolas en su papel como vehículo de entrada en los procesos de endocitosis en células no endoteliales.

Al inicio de esta Tesis, la ADA se había erigido como la única proteína capaz de unirse molecularmente al receptor A_1 de adenosina modulando su afinidad por ligandos tales como la R-PIA y se desconocía totalmente que este receptor o algún otro de la familia pudiera interactuar con proteínas distintas a las involucradas en la transducción de la señal. Sin embargo, a principios de los noventa se demostró que la activación de muchos receptores unidos a proteína *G* se podía alterar mediante la estimulación de otro receptor también acoplado a proteína *G*, postulándose que estas co-modulaciones eran fruto de un *cross-talk* entre las vías de señalización de ambos receptores. Así por ejemplo, se había descrito que los receptores de adenosina modulan de forma antagónica y específica los receptores de dopamina. Si la ecto-ADA tiene la capacidad de modificar las características de unión del receptor A_1 de adenosina por sus ligandos y esta modulación implica una unión molecular entre ambas proteínas, en esta Tesis Doctoral nos planteamos la posibilidad de una interacción molecular entre los receptores de adenosina y dopamina que pudiera explicar la relación antagónica entre ambos.

En esta Tesis Doctoral se demuestra por primera vez la interacción a nivel molecular entre dos receptores acoplados a proteína *G* y de acción antagonista, el receptor A_1 de adenosina y el receptor D_1 de dopamina. Mediante técnicas de inmunoprecipitación, inmunocitoquímica y microscopía confocal se demuestra la existencia de coprecipitación y elevada colocalización entre los receptores adenosínicos A_1 y los dopaminérgicos D_1 en células doblemente transfectadas con el cDNA de ambos receptores. Esta colocalización es sorprendentemente, modulada de forma diferencial por el agonista del receptor A_1 de adenosina; R-PIA y por el agonista del receptor D_1 de dopamina SKF. Una vez establecida la existencia de heterodímeros o heteroagregados entre el receptor A_1 de adenosina y el receptor D_1 de dopamina, interacción que tiene una repercusión funcional, nos planteamos si la ecto-ADA podía también estar jugando un papel importante tal y como sucedía cuando nos encontrábamos tan sólo ante la pareja receptor de adenosina y ecto-ADA. Mediante técnicas de unión de radioligandos e inmunocitoquímica se ha

demostrado la modulación de los receptores de dopamina D₁ mediante la ecto-ADA a través de los heterodímeros A₁D₁.

Hasta este momento nos hemos planteado una acción de la ecto-ADA a través del receptor A₁ de adenosina y por extensión a través del receptor D₁ de dopamina como un mecanismo de comunicación intracelular sin embargo la ecto-ADA por su localización en membrana plasmática podía también ejercer un papel en la comunicación célula-célula. El papel del CD26 en fenómenos de adhesión es un hecho ya ampliamente conocido así el CD26 tiene capacidad de unión a colágeno, fibronectina o al CD45 el cual a su vez se ha demostrado controla la adhesión celular a nivel de integrinas. No era por tanto descabellado plantearnos como cuarto objetivo de esta Tesis y puesto que existe una interacción ecto-ADA/CD26 si dicha interacción podía estar jugando un papel en la adhesión célula-célula. A éste respecto hemos puesto de manifiesto que la adhesión célula-célula está modulada por la interacción ADA/CD26 no sólo actuando como vehículo de anclaje entre dos células sino produciendo una activación de integrinas.

Los resultados obtenidos en esta Tesis ponen de manifiesto dos hechos importantes. Por primera vez se describe que distintos receptores para distintos ligandos (receptor A₁ de adenosina y receptor D₁ de dopamina) pueden formar heterodímeros funcionales y en segundo lugar establecemos un doble papel de la ecto-adenosin desaminasa como mediador de la respuesta intracelular e intercelular.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS.

CULTIVOS CELULARES.

La línea LLC-PK₁ derivada de túbulo renal de cerdo (American Type Cultured Collection; ATCC) se cultiva (37°C, 5 % CO₂) en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO, Life Technologies, Barcelona, Spain) suplementado con 5 % (v/v) de suero de caballo (HS), 1% de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina).

Las células CACO-2 derivadas de un adenocarcinoma de colon humano aisladas de un tumor primario han sido cedidas por el Dr García de Herreros del Instituto Municipal de Investigaciones Médicas, INIM, de Barcelona, España. Estas células se cultivan en las mismas condiciones antes descritas utilizando un 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS).

Las células D₁ y A₁D₁, fibroblastos de rata Ltk⁻ transfectados establemente con el cDNA humano de D₁R y/o con el cDNA humano del A₁R, se cultivan en el mismo medio antes descrito suplementado con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS) y en presencia de higromicina B a una concentración de 300µg/ml y/o geneticina (G-418) a una concentración de 200µg/ml como antibióticos de selección.

Las células parentales Jurkat J32 (ATTC) y el clon #11, el cual sobreexpresa CD26 (Tanaka et al, 1992), cedido por el Dr C. Morimoto (Harvard University, Boston, USA), derivan de una leucemia T humana. La línea celular derivada de una leucemia humana de tipo B, SKW6.4, fue proporcionada por el Dr Moyano del Laboratorio de Investigación Merck Química (Barcelona, España). Los distintos clones de células CEM, derivados de una leucemia linfoblástica aguda, (CEM^{NO1} transfectadas con el vector de resistencia al antibiótico de selección, CEM^{LO2} transfectadas con el cDNA del CD26 humano y CEM^{5C2} transfectadas con el antisense de CD26) proceden del laboratorio del Dr Hovanessian (Instituto Pasteur, París, Francia). Todas estas células se cultivan en RPMI-1640 (37°C, 5 % CO₂) suplementado con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml

de estreptomicina). La geneticina (G-418) a una concentración de 500 µg/ml fue usada como antibiótico de selección.

Los cultivos primarios de neuronas corticales se obtienen a partir de embriones de rata (Sprague Dawley) de 17-18 días con la colaboración de la Dra Joelle Hillion del Departamento de Neurociencia del Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia) según el protocolo descrito por Villalba et al, 1994.

ANTICUERPOS.

Los anticuerpos anti-ADA y anti-A₁R se generan por inmunización de conejos hembras New Zealand White. Los anticuerpos anti-A₁R (PC21, dirigido contra un péptido perteneciente al segundo loop extracelular y PC11, dirigido contra un péptido perteneciente al tercer loop intracelular) se purifican a partir de los sueros por cromatografía de afinidad usando una resina de Sepharose CL4B (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) a la que previamente se ha acoplado el péptido correspondiente al segundo loop extracelular o tercer loop intracelular. El anticuerpo anti-ADA, dirigido contra la ADA purificada de intestino de buey, se purifica por cromatografía de afinidad utilizando una resina (cianogen bromide activated Sepharose; Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) previamente acoplada a ADA bovina. La caracterización y afinidad de ambos anticuerpos, anti-ADA y anti-A₁R, ha sido extensamente descrita en anteriores trabajos. (Ciruela et al, 1995 y Aran et al, 1991).

Los anticuerpos monoclonales anti-β₁ LIA 1/2 (dirigido contra integrinas generales y caracterizado por Arroyo et al, 1992) y HUTS-21 (dirigido contra integrinas activadas y caracterizado por Luque et al, 1996) fueron cedidos por el doctor Sanchez-Madrid del Hospital de la Princesa (UAM, Madrid, España).

El anticuerpo policlonal anti-D₁R fue cedido por el doctor K. Fuxe del Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia) su caracterización ha sido descrita por Bjelke et al, 1996.

El anticuerpo policlonal anti- D₂R fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology

El anticuerpo monoclonal anti-CD26 humano 4H12 dirigido contra un epítipo distinto del centro de unión de la ADA fue adquirido en Endogen Inc. (Boston

USA). El anticuerpo monoclonal anti-CD26 humano Ta 5.9-CC1-4C8 dirigido contra el centro de unión de la ADA fue suministrado por Eurogenetics (Belgica). El anticuerpo anti-CD26 conjugado directamente a rodamina (Ta1-TRITC) se obtuvo de Coulter Immunology (Florida, USA).

El anticuerpo policlonal anti-caveolina fue obtenido de Transduction Laboratories (Mamhead, UK).

El anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano procedía de Boehringer-Mannheim (GmbH, Germany). El anticuerpo de cabra anti-conejo procedía de Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). El anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con fluoresceína procedía de Sigma Chemical (St Louis, MO, USA).

La proteína A oro fue cedida por los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona (España).

Tanto el isocianato de tetrametilrodamina (TRITC) como el isocianato de fluoresceína (FITC) usado para marcar directamente los distintos anticuerpos procedían de SIGMA-Chemical CO (St Louis, MO, USA).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

La técnica de inmunocitoquímica y análisis por microscopía electrónica se ha utilizado para investigar el proceso de internalización inducida por agonistas del receptor A_1 de adenosina conjuntamente con la adenosina desaminasa. Esta técnica, a diferencia del análisis por microscopía confocal, permite no sólo conocer la cinética de internalización sino conocer la naturaleza a nivel ultraestructural de las vesículas implicadas en dicha internalización.

Para ello las células renales LLC-PK₁ se incuban con el anticuerpo anti- A_1 R (PC21; 10 μ g/ml) o el anticuerpo anti-ADA (anti-ADA; 20 μ g/ml) en ausencia (control) o en presencia del agonista R-PIA 100 nM en DMEM-Hepes 20 mM-1 % BSA (tampón A) durante 2 h a 4 °C. A continuación se lavan en el mismo tampón a 4 °C y se incuban con proteína A-oro (20nm) a 4°C otros 45 min. Las muestras, una vez lavadas con tampón A precalentado a 37 °C, se llevan al incubador (37 °C) para permitir la internalización. Tras 0 min, 15 min, 30 min o 24 h, las células se lavan dos veces suavemente con el tampón A precalentado a 37°C, se lavan una vez con PBS pH 7.4 y se fijan en paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2.5 % en tampón cacodilato 0.1 M durante 1 h, a continuación

se tratan con OsO_4 al 1%, se deshidratan con etanol y se embeben en resina Spurr. Las muestras se cortan en un ultramicrotomo (ULTRACUT-E) obteniéndose ultrasecciones de 600 Å de grosor. Las ultrasecciones se contrastan con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo (Reynolds) y se analizan por microscopía electrónica (Hitachi H-600. EM Phillips).

Para los dobles marcajes con anti- A_1R y anti-ADA las células se incuban con anti-ADA (10µg/ml) en tampón A en ausencia (control) o en presencia del agonista R-PIA 100 nM durante 2 h a 4 °C, tras lo cual se lavan en el mismo tampón dos veces e incuban con proteína A-oro (10nm) a 4°C durante 45 min. La internalización se lleva a cabo durante 0 min o 30 min a 37°C. Las células se fijan en paraformaldehído al 2 % y glutaraldehído al 0.2 % en tampón cacodilato 0.1 M durante 1 h. Las muestras se inflitran y embeben en Lowicryl HM 20 a - 45°C polimerizándose dicha resina con luz ultravioleta. Las ultrasecciones obtenidas se lavan (2 lavados de 5 min) con PBS-Gly 0.1M, se permeabilizan con saponina al 0.02 % durante 20 min y se incuban con anti- A_1R (PC21; 10µg/ml) diluido en tampón de bloqueo (PBS-BSA al 1 %) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de un par de lavados con tampón de bloqueo las muestras se incuban con proteína A-oro (20nm) como anticuerpo secundario durante 45 min a temperatura ambiente y se lavan con PBS (3 lavados de 5 min) y agua destilada. Para dobles marcajes con anti- A_1R o anti-ADA y anti-caveolina se siguió este mismo protocolo, utilizando en este caso un anticuerpo policlonal anticaveolina (1:75)

PURIFICACIÓN DE FRACCIONES DE MEMBRANA RICAS EN CAVEOLINA POR UN MÉTODO LIBRE DE DETERGENTES.

Una de las conclusiones alcanzadas en esta Tesis Doctoral es que el receptor A_1 de adenosina sufre un proceso de endocitosis inducida por agonistas en el que están involucradas las caveolas.

Existen protocolos bien establecidos de separación de caveolas de otras fracciones de membrana y de proteínas citosólicas que se basan en la densidad específica de las membranas ricas en caveolas y su resistencia a la solubilización por detergentes no iónicos tipo Tritón X-100 a bajas temperaturas (Sargiacomo et al, 1993). Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto que el uso de este tipo de detergentes en los pasos iniciales de la homogenización puede llevar a la pérdida de algunas proteínas asociadas a caveolas como es el caso de la subunidad $G_{\beta\gamma}$. Para obviar este problema se ha optado por un sistema de purificación de caveolas libre de

detergentes. El método se basa en una disrupción celular por sonicación en un medio que contiene carbonato sódico (Song et al, 1996).

Las células LLC-PK₁ se crecen en placas de 150-mm de diámetro hasta la confluencia y se incuban durante 30 min en ausencia (control) o en presencia del agonista R-PIA 100 nM. Tras dos lavados a 4 °C con PBS las células se desenganchan mecánicamente de la placa con ayuda de una escurpula y de 2 ml de carbonato sódico de pH 11.0. Las células se homogenizan con una jeringa de aguja 0.9 x 40 (20 veces), un Politron (Kinematica rotor PTA, 20TS, setting 3, Brinkmann Instruments, Westbury, USA) tres veces durante 10 s y se sonicán (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonic Corp., Danbury, CT) tres veces 20 s. El homogenizado se lleva al 45 % de sacarosa por adición de 2 ml de sacarosa al 90 % preparada en MBS (25mM Mes, 0.15M NaCl, pH 6.5) y se deposita en el fondo de un tubo de ultracentrífuga en el que se crea un gradiente de sacarosa entre el 5 % y el 35 % (4 ml de sacarosa al 5 %/ 4ml de sacarosa al 35% diluidas ambas en MBS que contiene 250 mM de carbonato sódico). Se centrifuga a 105,000 x g durante 16-20 h en un rotor SW41Ti. Una banda de color blanquecino aparece confinada en la región de sacarosa correspondiente al 15-20 % la cual corresponde a la fracción rica en caveolina y excluye proteínas celulares no presentes en caveolas. De cada tubo se recogen fracciones de 1 ml hasta un total de 9 fracciones que se someten a electroforesis y análisis por Western Blot. Para ello, alícuotas de cada fracción que contienen igual concentración de proteína se tratan con tampón de carga SDS-PAGE (62 mM Tris-HCl, 1 % SDS, 10 % de glicerol, 1 % de β -mercaptoetanol y 0.002 % de azul de bromofenol, pH 6.8) durante 1 min a 100 °C y se cargan en un gel de poliacrilamida al 15 %. La electroforesis se efectúa según el método de Laemmli et al, 1970 a voltaje constante (200 V) y por transferencia semi-seca (Bio-Rad Trans-Blot) durante 1 h a 90 V en tampón de transferencia (25 mM de Tris, 192 mM de glicina y un 20 % de metanol, pH 8.3) las proteínas del gel se transfirieron a membranas PVDF (Immobilon-P; Milipore). Para evitar uniones inespecíficas las membranas de PVDF se bloquean toda la noche a 4°C con PBS-10 % (p/v) de leche desnatada en polvo. Las membranas se lavan tres veces (10 min por lavado) con TBS-TII (10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl y 0.5 % Tween-20) y se incuban durante 2 h a temperatura ambiente con 10 μ g/ml de anti-A₁R (PC11) o anti-caveolina (1:75) diluido en TBS-TI (50 mM Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 0.05 % de Tween-20, pH 7.4) que contiene 0.02 % NaN₃. Tras tres lavados de 10 min con TBS-TII, las membranas se incuban con anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (1:15000) durante 1 h a temperatura ambiente. Las

membranas se lavan cinco veces (10 min por lavado) en TBS-TII y se incuban con volúmenes iguales de los reactivos de detección ECL 1 y ECL 2 (Amersham). Finalmente las membranas se ponen en contacto con el film (Agfa Curix-Rp2) para visualizar las bandas inmunoreactivas.

MICROSCOPIA CONFOCAL.

En la actualidad se dispone de una amplia gama de fluorocromos ligados a anticuerpos que pueden ser utilizados en técnicas de inmunodetección por análisis de fluorescencia. La microscopía confocal con un barrido de láser, aprovecha esta técnica y permite detectar antígenos celulares a distintos niveles de la célula. Como característica más importante permite conocer el grado de colocalización entre dos proteínas marcadas con anticuerpos conjugados a fluorocromos distintos. Esto es una medida de lo cerca que se encuentran una de otra.

Immunocitoquímica con células PK

La técnica de inmunocitoquímica y análisis por microscopía confocal se ha utilizado en esta línea celular para investigar la naturaleza de las vesículas implicadas en la internalización conjunta del receptor A_1 de adenosina y de la adenosina desaminasa (ADA) inducida por un agonista del receptor A_1 de adenosina la R-PIA. Mediante esta técnica se han obtenido datos relevantes en la conclusión de que el receptor A_1 de adenosina y la ADA se internalizan vía caveolas.

Las células LLC-PK₁ se siembran en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro esterilizados previamente por calentamiento en una estufa a 200 °C durante dos horas. Las células se dejan crecer durante tres o cuatro días sin llegar a la confluencia. Sin previa fijación, se incuban en presencia de PC21 conjugado directamente con rodamina (PC21-TRITC; 50µg/ml) o anti-ADA conjugado directamente con rodamina (anti-ADA-TRITC; 50µg/ml) y el agonista del receptor A_1 de adenosina (R-PIA; 100 nM) durante 2h a 4°C. Pasado este tiempo de incubación, las células se lavan exhaustivamente con medio de cultivo (DMEM) libre de suero y se incuban 0 min, 30 min o 24 horas a 37°C para permitir la internalización del receptor o de la ADA. Las células se lavan con PBS (tampón fosfato salino pH 7.4) durante 10 min, se fijan 15 min con paraformaldehído al 4 %, se lavan (20 min) con PBS-Gly 20mM; se

permeabilizan 10 min con saponina al 0.02%, se bloquean con PBS-BSA al 1 % durante 30 min y finalmente se incuban durante 1 hora a 37°C con anti-caveolina conjugada directamente a fluoresceína (anti-caveolina-FITC; 1/75). Los cubreobjetos se montan con una gota de medio de montaje (immunofluorescence medium; ICN Biomedical Inc., Costa Mesa, CA, USA) y las muestras se analizan por microscopía confocal. (Microscopio confocal de scanning LEICA TCS 4D adaptado a un microscopio invertido Leitz DMIRBE; Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg) con el objeto de investigar la colocalización del receptor o la ADA con la caveolina en las vesículas de internalización.

Para estudiar el efecto de algunos tratamientos en el proceso de internalización del receptor A_1 de adenosina las células LLC-PK₁ se crecen en cubreobjetos sin llegar a la máxima confluencia y se incuban con ácido acético 5 mM durante 5 min, o con filipina 5 µg/ml durante 30 min, esta última mantenida durante toda la inmunocitoquímica. Las células se lavan con DMEM libre de suero y se incuban durante 30 min a 37°C con el agonista del receptor, R-PIA 100 nM. A continuación se fijan con paraformaldehído al 4%, se lavan con PBS-Gly 20 mM, se permeabilizan con saponina al 0.02% y se incuban con anti- A_1R conjugado a fluoresceína (PC21-FITC; 50 µg/ml) 1 h a 37°C. Las muestras se procesan para microscopía confocal como se ha descrito anteriormente.

Immunocitoquímica en células A_1D_1 y neuronas corticales.

Mediante la técnica de inmunocitoquímica se ha caracterizado la presencia del receptor A_1 de adenosina y el receptor D_1 de dopamina en fibroblastos de rata doblemente transfectados con el cDNA humano de ambos receptores así como en cultivos primarios de neuronas corticales de rata que expresan constitutivamente los dos receptores. El análisis mediante microscopía confocal ha permitido conocer la distribución y colocalización en la membrana plasmática de estos receptores y como sus ligandos modulan dicha distribución. Las células A_1D_1 o los cultivos primarios de neuronas corticales se crecen sin llegar a confluencia, en cubreobjetos de 10 mm de diámetro esterilizados previamente por calentamiento en una estufa a 200 °C durante dos horas. Los cubreobjetos se incuban durante 1 hora a 37°C en ausencia (control) o presencia del agonista del receptor A_1 , R-PIA 100 nM o del agonista del receptor D_1 , SKF-38393 10 µM o de ambos agonistas simultáneamente. Posteriormente las células se lavan con PBS durante 10 min, se fijan con un 4 % de paraformaldehído durante 15 min, se lavan durante 10 min con PBS-Gly 20

mM antes de permeabilizarlas con saponina al 0.01% (células A₁D₁) o Triton X-100 al 0.2 % (neuronas corticales) durante 7 o 5 min respectivamente y bloquearlas con PBS-1% BSA-0.001% de saponina (células A₁D₁) o PBS-1% BSA (neuronas corticales) durante media hora. El doble marcaje se lleva a cabo con anticuerpo anti-A₁R conjugado directamente con fluoresceína (PC21-FITC; 20 µg/ml en células transfectadas y 50 µg/ml en neuronas corticales) y anti-D₁R conjugado directamente a texas red (D₁-Tx; 5 µg/ml en células transfectadas y 10 µg/ml en neuronas corticales) durante 1 hora a 37°C en PBS-BSA al 1%. Los cubreobjetos se lavan tres veces con el mismo tampón y las muestras se analizan por microscopía confocal (ver subapartado anterior). Con el objetivo de estudiar la especificidad de la interacción A₁R/D₁R, se ha estudiado la distribución y modulación por agonistas de los receptores A₁ de adenosina y D₂ de dopamina tanto en fibroblastos doblemente transfectados con el cDNA del receptor A₁ de adenosina y el cDNA del receptor D₂ de dopamina como en neuronas corticales. Las células A₁R/D₂R se han tratado para su análisis por microscopía confocal siguiendo el mismo protocolo usado para las células A₁R/D₁R y usando en este caso un anticuerpo anti-A₁R conjugado a fluoresceína (PC21-FITC; 20 µg/ml) y un anticuerpo anti-D₂R conjugado a rodamina (anti-D₂R-TRITC; 5 µg/ml). Las neuronas de cortex cerebral de rata se han tratado siguiendo el mismo protocolo antes descrito pero en este caso las células tan sólo se han fijado, no se han permeabilizado. Las neuronas se han marcado con doblemente con PC21-FITC (50 µg/ml) y anti-D₂R-TRITC (20 µg/ml).

Puesto que el enzima ADA interacciona con el receptor A₁ de adenosina e internaliza con éste tras la estimulación por agonistas, también se ha estudiado la expresión de la ADA en un sistema que expresa receptores A₁ de adenosina y/o receptores D₁ de dopamina mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal. Para ello se siguió el mismo protocolo antes descrito pero usando los siguientes anticuerpos: anticuerpo anti-A₁R conjugado directamente con rodamina (PC21-TRITC; 20 µg/ml) y anticuerpo anti-ADA conjugado directamente con fluoresceína (anti-ADA-FITC; 40 µg/ml) o anti-D₁R conjugado directamente a texas red (D₁-Tx; 5 µg/ml) y anticuerpo anti-ADA conjugado directamente con fluoresceína (anti-ADA-FITC; 40 µg/ml).

Immunocitoquímica en células CACO-2 .

La expresión de la ADA, del receptor A₁ de adenosina y del cluster de diferenciación CD26 en la superficie de las células CACO-2 se ha investigado mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal. La caracterización de la

expresión de estas moléculas fue del todo necesaria para analizar su función en la adhesión de linfocitos a células epiteliales.

Las células CACO-2 (a subconfluencia) se crecen en cubreobjetos de 10 mm de diámetro y previamente esterilizados por calentamiento a 200°C. Las células se lavan 10 min con PBS, se fijan con paraformaldehído al 4 %, se lavan de nuevo con PBS-Gly 20 mM y finalmente se bloquean con PBS-BSA al 1% durante 30 min transcurridos los cuales, las células se incuban con anticuerpo anti-A₁R conjugado directamente a fluoresceína (PC21-FITC; 50µg/ml) y anticuerpo anti-ADA conjugado directamente a rodamina (anti-ADA-TRITC; 50µg/ml) o bien con anticuerpo anti-CD26 conjugado directamente a rodamina (Ta1-TRITC; 1/10) y anticuerpo anti-ADA conjugado directamente a fluoresceína (anti-ADA-FITC; 50µg/ml). Las muestras se analizan por microscopía confocal tal como se ha descrito anteriormente.

COINMUNOPRECIPITACION.

Si bien técnicas como la inmunocitoquímica analizada por microscopía confocal (veáse apartado anterior), permiten conocer lo próximas que se encuentran dos proteínas en la célula (membrana plasmática o citosol), lo que se conoce como grado de colocalización, la técnica de la coinmunoprecipitación es una aproximación experimental para investigar la interacción molecular entre dos proteínas. El disponer de anticuerpos contra el receptor A₁ de adenosina que inmunoprecipitan dicho receptor nos ha permitido estudiar la interacción del receptor A₁ de adenosina con dos proteínas de la membrana celular, en sistemas celulares distintos. Por un lado en fibroblastos de rata hemos coinmunoprecipitado el receptor A₁ de adenosina y el receptor D₁ de dopamina y en células epiteliales hemos logrado coinmunoprecipitar el receptor A₁ de adenosina con la adenosina desaminasa, en ambos casos lo que se demuestra es su interacción a nivel molecular.

Uno de los problemas de esta técnica es que en la posterior detección por western blot de las proteínas inmunoprecipitadas también se revelan las bandas de inmunoglobulinas del anticuerpo inmunoprecipitante. En nuestro caso esto representa un grave problema ya que la cadena pesada de las inmunoglobulinas enmascara todas las proteínas inmunoprecipitadas. Para evitar

este problema se ha usado la técnica de la unión covalente del anticuerpo inmunoprecipitante a bolas de proteína A-Sepharosa. La unión se realiza en condiciones saturantes (11 mg de anticuerpo/ml de proteína A-Sepharosa). El anticuerpo anti- A_1 (PC11), el anticuerpo anti- D_2 , o como control negativo un anticuerpo irrelevante de cabra anti-conejo se han unido a bolas de proteína A-Sepharosa. Para ello se mezclan, a temperatura ambiente, en las proporciones antes citadas, dichos anticuerpos con proteína A-Sepharosa en tampón borato 0.1 M, pH 8.2. Pasados 30 min se lava dos veces con tampón borato y dos veces con trietanolamina 0.2 M, pH 8.2. Se centrifuga a 500 x g y se resuspende en 20 volúmenes de DPD (Dimetil pimelimidato) 50 mM preparado en trietanolamina 0.2 M, dejando que tenga lugar la reacción de acoplamiento durante 45 min a temperatura ambiente. La reacción de acoplamiento se para por centrifugación de las muestras a 500 x g durante 1 min y resuspensión en un volumen igual de trietanolamina 50 mM pH 8.2. La mezcla se guarda en tampón borato 0.1 M que contiene 0.02 % de NaN_3 .

Coinmunoprecipitación de los receptores A_1 de adenosina y D_1 de dopamina en células $A_1 D_1$.

Con el propósito de investigar si el antagonismo funcional entre los receptores A_1 de adenosina y D_1 de dopamina es debido a una interacción molecular entre ambos receptores se llevaron a cabo ensayos de coinmunoprecipitación. Para ello las células cotransfectadas $A_1 D_1$ se incuban en ausencia o presencia de 100 nM del agonista del receptor A_1 de adenosina R-PIA, 10 μ M del agonista del receptor D_1 de dopamina SKF-38393 o ambos agonistas simultáneamente en medio DMEM libre de suero durante 1 h a 37°C. Las células se homogenizan con ayuda de un politrón (Politron; Kinematica, PTA 20TS rotor, setting 4; Brinkmann Instruments, Westbury, USA) tres veces durante 5 s en de Tris-HCl 50mM, pH 7.4 y se centrifugan a 105,000 x g, 45 min a 4 °C con el fin de obtener membranas celulares. Las membranas se solubilizan en tampón de lisis I (PBS, pH 7.4 con 1% de Nonidet NP-40, 0.5% (p/v) de desoxicolato sódico y 0.1% (p/v) de SDS) a 4°C durante 1 h y posteriormente se centrifugan a 80,000 x g durante 90 min. Los sobrenadantes (1 mg/ml) se incuban (6 h) con bolas de proteína A-Sepharosa con el fin de clarificar la muestra ("pre-cleaning"). Después de una centrifugación a 10,000 x g de 15 s, los sobrenadantes se incuban durante toda la noche a 4°C con 12 μ l del anticuerpo anti- $A_1 R$ (PC11) o del anticuerpo irrelevante de cabra anti-conejo, previamente unidos covalentemente a proteína A-Sepharosa. La inmunoprecipitación no

específica se lleva a cabo por incubación de la misma cantidad de proteína A-Sepharosa unida a anti-A₁R con solubilizados de membrana obtenidos a partir de células D₁, transfectadas únicamente con el cDNA humano del receptor D₁ de dopamina, por lo que no expresan receptor A₁ de adenosina. Los inmunoprecipitados se lavan dos veces con tampón de lisis II (PBS, pH 7.4 con 0.1 % (v/v) de Nonidet NP-40, 0.05 % (p/v) de desoxicolato sódico y 0.01 % (p/v) de SDS) y una vez con PBS pH 7.4 a 4°C. El inmunoprecipitado unido a las bolas de proteína A-Sepharosa se resuspende en 60µl del tampón de carga SDS-PAGE sin β-mercaptoetanol durante 15 min a 37 °C y los sobrenadantes se separan por centrifugación a 10, 000 x g y se analizan por western-blot en geles al 12.5 % de poliacrilamida (ver subapartado purificación de fracciones de membrana ricas en caveola por un método libre de detergentes), revelando las bandas con un anticuerpo anti-A₁R (10µg/ml) o un anticuerpo anti-D₁R (10µg/ml)

diluidos en TBS-TI.

Para la inmunoprecipitación en células A₁R/D₂R, se ha seguido el mismo protocolo antes descrito utilizando en este caso un anticuerpo inmunoprecipitante anti-A₁R o anti-D₂R.

Coinmunoprecipitación de ADA y de A₁R de adenosina de células LLC-PK₁

Con el propósito de investigar si la modulación que ejercía la ADA sobre el receptor A₁ de adenosina se debía a una interacción molecular entre ambas proteínas se coinmunoprecipitaron ambas moléculas utilizando el protocolo antes descrito. En este caso el anticuerpo de inmunoprecipitación también es el anticuerpo anti-A₁ unido covalentemente a proteína A-Sepharosa y como anticuerpo irrelevante se usa un anticuerpo de cabra anti-conejo unido a proteína A-Sepharosa. Los inmunoprecipitados se analizaron por SDS-PAGE y western-blot revelando con el anticuerpo anti-A₁R (10µg/ml) o el anticuerpo anti-ADA (10µg/ml) diluidos en TBS-TI

CITOMETRÍA DE FLUJO.

El análisis por citometría de flujo de células marcadas con un anticuerpo conjugado a un fluorocromo nos permite identificar las células que presentan el

antígeno. El análisis de los resultados por el programa Inmuno-4 suministrado por Elite (Coulter Corporation, Hialeah, Florida) permite realizar un análisis cuantitativo del antígeno expresado por estas células y comparar la expresión basal con la expresión estimulada con algún agente.

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado la citometría de flujo para la cuantificación de la expresión de proteínas en la superficie celular. Esta técnica ha sido imprescindible para determinar el contenido de CD26 de la superficie de células Jurkat y de células CEM transfectadas o no con la proteína humana y para cuantificar la expresión de integrinas totales e integrinas activadas de células Jurkat y células CEM. Con esta técnica se han obtenido resultados determinantes para establecer cual es el papel de la ADA de superficie en la adhesión celular.

Expresión de CD26 en la superficie celular.

Las células (Jurkat y Jurkat #11 y los clones CEM^{NO1} y CEM^{LO2}) se crecen en flascones de cultivo en condiciones estándar durante dos días. Se centrifugan (500 x g, 5 min) y se resuspenden en PBS 10 mM de pH 7.4. Se cuentan en la cámara de Neubauer y se separan en alícuotas de 1×10^6 células. Las células se fijan con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 min y se lavan dos veces en PBS- Gly 20 mM. Después de una incubación de 30 min con PBS- Gly 20 mM- BSA al 1 % (tampón A), las células se incuban con anti-CD26-FITC (Ta1-FITC; dilución 1/10) en un volumen final de 50 μ l. Las células se lavan un par de veces con tampón A. Como control se utiliza un anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con fluoresceína a una dilución 1/300. Tras la incubación con el anticuerpo las células se lavan tres veces con tampón A y se resuspenden en PBS para ser analizadas por citometría de flujo en un citómetro EPICS Profile (Coulter; Hialeah, FL).

Expresión de integrinas.

Las células Jurkat y Jurkat #11 (que sobreexpresan CD26) se crecen en flascones de cultivo en condiciones estándar durante dos días. Se centrifugan (500 x g, 5 min) y se resuspenden en tampón Hepes-NaCl (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mg/ml D-glucosa, pH 7.4). Se cuentan en la cámara de Neubauer y

se separan en alícuotas de 1×10^6 células, se lavan dos veces con tampón Hepes-NaCl y se preincuban con 10 $\mu\text{g/ml}$ o 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADA durante 30 min a 37°C en 500 μl del mismo tampón. Tras este tratamiento las células se incuban a 37 °C con el anticuerpo monoclonal LIA 1/2 (dilución 1:2) o HUTS-21 (dilución 1:2) en 50 μl de tampón Hepes-NaCl en presencia o ausencia de MnCl_2 1 mM. Transcurridos 30 min las células se lavan tres veces con 200 μl de tampón Hepes-NaCl y se incuban con 50 μl de una dilución 1:300 del anticuerpo secundario conjugado directamente a fluoresceína (IgG de oveja anti-ratón-FITC). Las células se lavan tres veces en PBS y se fijan con 400 μl de paraformaldehído al 4 %. Las muestras se analizan por citometría de flujo en citómetros EPICS Profile (Coulter, Hialeah, FL).

ENSAYOS DE ADHESIÓN

El posible papel del ecto-ADA, del receptor A_1 de adenosina y del CD26 en la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular se ha analizado mediante experimentos de adhesión linfocitos-células epiteliales y linfocitos-placas de fibronectina.

Estos experimentos, conjuntamente con el análisis de la activación de las integrinas, nos ha permitido concluir que el módulo ADA-CD26 participa en los fenómenos de adhesión.

Adhesión célula-célula.

Los ensayos de adhesión célula-célula se realizaron según lo descrito por Johnson et al, 1993. Se sembraron 1.5×10^5 células epiteliales CACO-2 en placas de 6 pozos (35mm) dejándose crecer en medio DMEM suplementado con 10 % FBS hasta la confluencia. Los linfocitos T (Jurkat y Jurkat #11), los linfocitos B (SKW6.4) o los timocitos (CEM^{NO1} , CEM^{LO2} , CEM^{5C2}) se diluyen en dos flascos de 75 cm^2 de tal manera que la concentración de los dos flascos sea la misma (5×10^5 células/ml). Uno de estos flascos actúa como control de contaje celular, mientras que al otro se adiciona 1 μl [H^3]-timidina (0.2 $\mu\text{Ci/ml}$) por cada 5 ml de medio y se incuba 24 h. Pasado este tiempo, se cuenta el número de células que hay en el flascón control mediante la cámara de Neubauer y a partir de este contaje se coge un volumen de células marcadas radioactivamente suficiente para interaccionar a razón de 1×10^6 células/pozo de células CACO-2 confluentes. Estas células se lavan dos veces con 25 ml

de PBS a 37 °C para eliminar la [H^3]-timidina libre del medio y se diluyen en RPMI-1640-0.6 % BSA-10 % FBS (tampón A). Las células sanguíneas se adicionan a la monocapa de células CACO-2 confluyente y se mantienen durante 45 min a 37 °C. Pasado este tiempo se aspira el medio y se realizan dos lavados por aspiración en PBS a 37 °C. A cada uno de los pozos se añade 1 ml de SDS al 0.2 % y se deja 90 min en agitación. Alícuotas de 950 μ l de cada pozo se ponen a contar en viales estándar con 10 ml de líquido de centelleo (Formula-989; New England Nuclear Research Products). La radioactividad se cuantificó en un contador β (1600 TRICARB; Packard, Meriden, CT, USA) con un 50 % de eficiencia. El cálculo del número de linfocitos o timocitos que se corresponde a la radioactividad medida en cada vial se determina conociendo la relación radioactividad/ n° de células radiomarcadas con [H^3]-timidina. Los valores se expresan en porcentaje de adhesión referido a células control (células no tratadas). Cada punto se realizó por triplicado.

Cuando se estudia la influencia de diferentes efectores en la interacción célula-célula, los linfocitos diluidos en RPMI-1640-0.6 % BSA-10 % FBS o la monocapa de células CACO-2 se incuban antes del ensayo de adhesión durante 30 min con:

- anti-CD26 dirigido contra el centro de unión del ADA (Ta5.9; 5 μ g/ml).
- anti-CD26 dirigido contra un epítipo distinto del de unión del ADA (4H12, 5 μ g/ml).
- anticuerpo irrelevante (IgG de cabra anti conejo, 5 μ g/ml).
- Adenosina desaminasa (10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml).

Todos ellos se mantienen durante el ensayo de adhesión.

Ensayos de adhesión a fibronectina.

Una placa de 96 pocillos (DYNATECH) se tapiza con 50 μ l de fibronectina de plasma humano a una concentración de 10 μ g/ml por incubación durante 24 h a 4°C o, alternativamente, 2 h a 37°C. La fibronectina no adherida se elimina por decantación de la placa y lavado de la misma con 200 μ l de PBS. La placa se bloquea (1 h a 37°C) con 200 μ l de PBS que contienen un 1 % de BSA y se incuba con 1×10^5 linfocitos T (Jurkat o Jurkat #11) resuspendidos en RPMI-1640 al 1 % de BSA y concentraciones crecientes de ADA (10, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml) preparada en el mismo medio. La incubación se prolonga durante 1 h a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ y una humedad relativa del 90 %.

Después de la incubación los pocillos se lavan por inmersión de la placa en PBS con el fin de eliminar las células no adheridas. Las células se fijan con 50 μ l de paraformaldehído al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente y se lavan nuevamente por inmersión en PBS. Las células adheridas se tiñen con 50 μ l de cristal violeta al 0.1 % durante 20 min, eliminándose el exceso de este reactivo mediante lavados por inmersión en PBS. La placa se deja secar en la estufa durante 24 h, se lee a 630 nm en el contador Merck Elisa System Mios versión 3.2, después de homogenizar los pocillos con 100 μ l de HCl 0.1 M. El blanco de lectura lo constituyen pocillos a los que no se ha unido fibronectina y los controles son las células adheridas en ausencia de ADA. De cada punto se realizaron 6 réplicas.

RESULTADOS

CAPITULO 1

EL RECEPTOR A₁ DE ADENOSINA Y LA ADENOSINA DESAMINASA SON SECUESTRADOS E INTERNALIZADOS EN CAVEOLAS TRAS LA ESTIMULACIÓN CON EL AGONISTA R-PIA.

La desensibilización, es un fenómeno ubicuo en el cual una célula atenúa su respuesta tras la estimulación prolongada o crónica a un agonista. Tras la interacción con dicho agonista, algunos receptores sufren un proceso de internalización y *down-regulation* con una pérdida neta de sitios de unión en la superficie celular (Benovic et al, 1988).

Distintas rutas de internalización se han descrito para los receptores acoplados a proteínas G. El receptor β_2 -adrenérgico en células humanas 293, el receptor humano de la hormona gonadotropina coriónica, el receptor de la trombina y otros, internalizan vía la ruta clásica de endocitosis iniciada en las vesículas recubiertas de clatrina (Zastrow et al, 1992; Hoxie et al, 1993). Sin embargo recientemente, se ha descrito que el receptor de colecistoquinina puede internalizar vía dos rutas distintas, una dependiente y otra independiente de clatrina (Roettger et al, 1995). Este hecho ha permitido sugerir un posible papel de las caveolas en los procesos de endocitosis de los receptores acoplados a proteínas G. Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (50-100nm de diámetro) con una forma típica de omega, caracterizadas por una composición alta en colesterol y esfingolípidos (Sargiacomo et al, 1993). Estas estructuras se han detectado en numerosos tipos celulares siendo particularmente abundantes en adipocitos, células musculares y células endoteliales. La proteína principal de estas estructuras es la caveola o caveolina-1, una proteína integral de membrana de 20-24 kDa que puede formar homooligómeros (Monier et al, 1995). Desde un punto de vista funcional las caveolas son estructuras implicadas en la señal de transducción (Lisanti et al, 1994), en la internalización de pequeñas moléculas mediante un proceso llamado potocitosis (Anderson 1993a, Anderson et al, 1992) y en la transcitosis (Anderson et al, 1993b). El papel de las caveolas en los procesos de señalización se propuso tras la localización en estas invaginaciones de algunos mediadores extracelulares, receptores y sistemas efectores. Las caveolas contienen endotelina y su receptor (Chun et al, 1994), el péptido natriurético atrial (Page et al, 1994), el factor PDGF (Liu et al, 1996), algunas subunidades de las proteínas G heterotriméricas (Sargiacomo et al, 1993;

Chang et al, 1994; Smart et al, 1995), la isoforma endotelial de la nítrico óxido sintasa (García-Cardena et al, 1996; Shaul et al, 1996), quinasas de la familia Src (Glenney et al, 1989; Arreaza et al, 1994), la protein quinasa $C\alpha$ (Glenney et al, 1989), bombas de Ca^{2+} (Arreaza et al, 1994), el receptor de inositol 1, 4, 5-trifosfato (Fujimoto et al, 1992), el receptor de bradiquina B2 (de Weerd et al, 1997). El significado de la asociación de cada una de estas proteínas con las caveolas no se conoce con exactitud. Una teoría es que las caveolas sirven como compartimentos en los que se concentran los componentes de una vía de señalización, de modo que se incrementa la eficiencia y rapidez de acoplamiento de los receptores con más de un sistema efector (Lisanti et al, 1994) sin embargo, el papel de las caveolas sigue siendo un tema en estudio y controvertido.

La adenosina, vía sus receptores de membrana, ejerce de forma específica su acción en un amplio rango de sistemas fisiológicos, incluyendo el sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, urogenital, respiratorio y el sistema linfático (Olah and Stiles, 1993; Tucker and Linden, 1993; Dalziel and Westfall, 1994). La desensibilización inducida por agonistas del receptor A_1 de adenosina se ha estudiado en diversos tejidos y sistemas celulares como los adipocitos (Longabaugh et al, 1989) o la línea celular DDT₁MF-2 de musculatura lisa de hámster (Ramkumar et al, 1991; Ciruela et al, 1997). La exposición crónica de las células DDT₁MF-2 a una concentración 50 nM del agonista R-PIA, conduce a una desensibilización funcional del receptor y a una rápida (15min) agregación, fosforilación y lenta internalización del receptor A_1 de adenosina. Por otro lado, la concentración de adenosina extracelular está regulada por la ADA de la superficie celular. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que en estas mismas células (DDT₁MF-2) la ADA de la superficie celular interacciona con el receptor A_1 de adenosina, modulando de este modo la señalización, la desensibilización e internalización inducida por ligando del receptor de adenosina (Saura et al, 1996; Ciruela et al, 1997). Mientras los mecanismos bioquímicos implicados en el proceso de desensibilización han sido descritos ampliamente, la ruta intracelular y los compartimentos implicados en el secuestro e internalización de los receptores acoplados a proteínas G son muy poco conocidos. Aunque se acepta que la endocitosis mediada por clatrina es la ruta predominante por la que los receptores acoplados a proteínas G son internalizados (Böhm et al, 1997), otras rutas de endocitosis que impliquen vesículas no revestidas deben tenerse en cuenta.

En este trabajo, hemos demostrado la interacción entre el receptor A_1 de adenosina y la ADA en la superficie de las células LLC-PK₁. La activación del receptor por el agonista R-PIA, induce la agregación de ambas proteínas en la superficie celular y la posterior translocación a compartimentos intracelulares. Con el fin de estudiar las rutas endocíticas implicadas en el tráfico del receptor A_1 de adenosina y la ADA, mediante microscopía confocal y electrónica se ha estudiado la cointernalización de ambas moléculas tras la activación del receptor. Nuestros resultados han demostrado que el receptor A_1 de adenosina internaliza vía la misma ruta que la ADA y que en ambos casos se trata de una ruta independiente de vesículas de clatrina que implica caveolas.

RESULTADOS.

1- El agonista R-PIA induce la internalización del receptor A_1 de adenosina y de la ADA de la superficie celular.

Con el fin de estudiar la internalización del receptor A_1 de adenosina en respuesta al agonista R-PIA, las células LLC-PK₁ se han incubado (4°C, 2h) con el anticuerpo anti- A_1 R, PC21, dirigido contra el segundo bucle extracelular en presencia o ausencia de R-PIA 100 nM. Tras lavar las células exhaustivamente, se incuban con proteína A-oro (4°C, 45 min) y se mantienen a 37°C durante 0 min, 15 min, 30 min o 24 h para permitir la internalización del receptor. Las muestras se procesan para su análisis por microscopía electrónica como se indica en Materiales y métodos. En ausencia de anticuerpo primario las células no presentan ningún marcaje (resultados no presentados, CAL POSAR-HO????). En las células control (células no tratadas con el agonista) el receptor aparece de forma exclusiva en la membrana plasmática homogéneamente distribuido (Figura 1A). El mismo patrón de marcaje se observa para todas aquellas células no tratadas con R-PIA pero mantenidas distintos tiempos a 37°C (células control). La exposición de las células LLC-PK₁ al agonista R-PIA, induce tras 15 min a 37°C la agregación del receptor A_1 de adenosina en la superficie celular (Figura 1B). La internalización del receptor es más evidente tras 30 min, en este caso, las partículas de oro se encuentran localizadas en endomas tempranos (*early endosomes*) y cuerpos

multivesiculares (Figura 1C). El número de partículas de oro internalizadas se incrementa con el tiempo de incubación (resultados no presentados). Para el receptor A_1 de adenosina se ha descrito una *down-regulación* o disminución del número total de receptores de una forma dosis-dependiente cuando las células se tratan crónicamente con agonistas (Fernández et al, 1996; Ruiz et al, 1996; Ciruela et al, 1997). En consonancia con estos resultados, el receptor A_1 de adenosina se localiza en compartimentos intracelulares morfológicamente similares a los cuerpos lisosomales tras 24 horas de exposición al agonista R-PIA (Figura 1D).

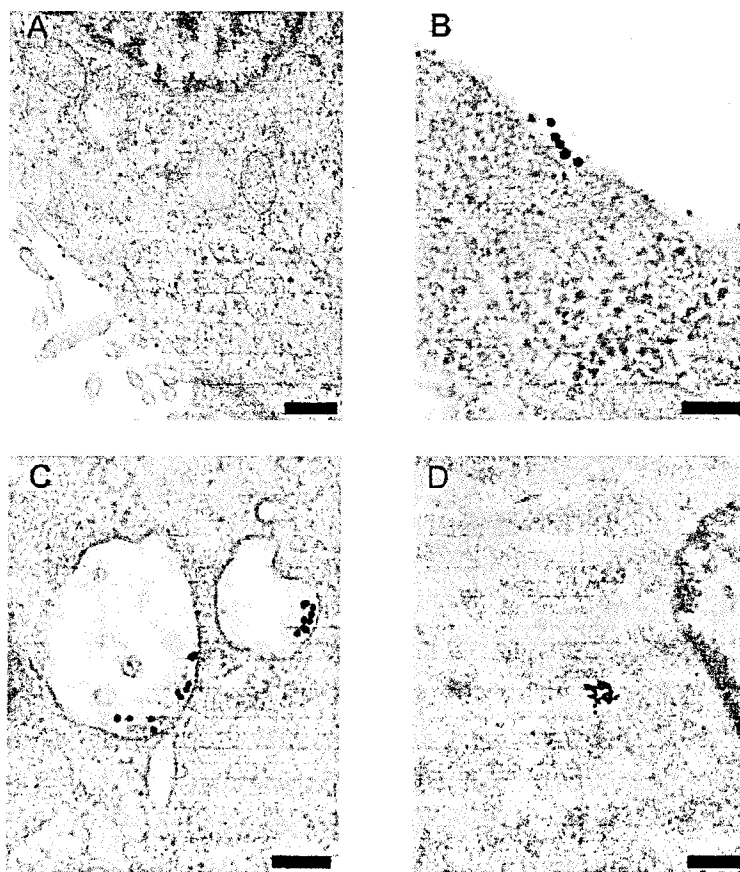


Figura 1. Estudio a nivel ultraestructural de la internalización del receptor inducida por R-PIA. Las células se han incubado (2h, 4°C) en DMEM-Hepes-BSA en presencia del anticuerpo anti- A_1R y sin (A) o con (B, C y D) R-PIA 100nM. Las células una vez lavadas se incuban (45 min a 4°C) con proteína A-oro (20nm). Las células se lavan nuevamente con tampón frío y se incuban 15 min (B), 30 min (C) o 24 h (D) a 37°C. Las células se fijan, embeben en resina Spurr y se obtienen secciones ultrafinas que son analizadas por microscopía electrónica como se describe en Materiales y métodos. El panel A corresponde a células a 0min de internalización y no tratadas con R-PIA, no se han encontrado diferencias significativas tras 15min, 30 min o 24h de internalización. Barra de escala 0.1µm

La desensibilización e internalización inducida por agonistas del receptor A_1 de adenosina están moduladas por varios factores, entre ellos la ADA. Nuestro grupo de investigación ya había descrito anteriormente que la ADA puede interaccionar con el receptor A_1 de adenosina en corteza cerebral de cerdo y en la línea celular DDT₁ MF-2. La ADA de la superficie celular, de una forma independiente de su actividad catalítica, afecta a la señalización del receptor A_1 de adenosina, acelera la fosforilación, la desensibilización e internalización del A_1 R inducida por ligandos (Saura et al, 1996; Ciruela et al, 1996; Saura et al, 1998). Para investigar si el A_1 R y la ADA interaccionan en la superficie de las células LLC-PK₁ se han llevado a cabo ensayos de coimmunoprecipitación. El análisis por western blot de los lisados de membrana, muestra una elevada expresión de A_1 R en las membranas de las células LLC-PK₁ (Figura 2). La inmunoprecipitación de las membranas solubilizadas con el anticuerpo anti- A_1 R (PC11) rinde una banda de 40 kDa correspondiente al receptor A_1 de adenosina y una banda de 44 kDa revelada con un anticuerpo anti-ADA. En ambos casos se ha utilizado un anticuerpo irrelevante como control negativo. Estos resultados indican que el A_1 R y la ADA forman un complejo en la superficie de las células LLC-PK₁.

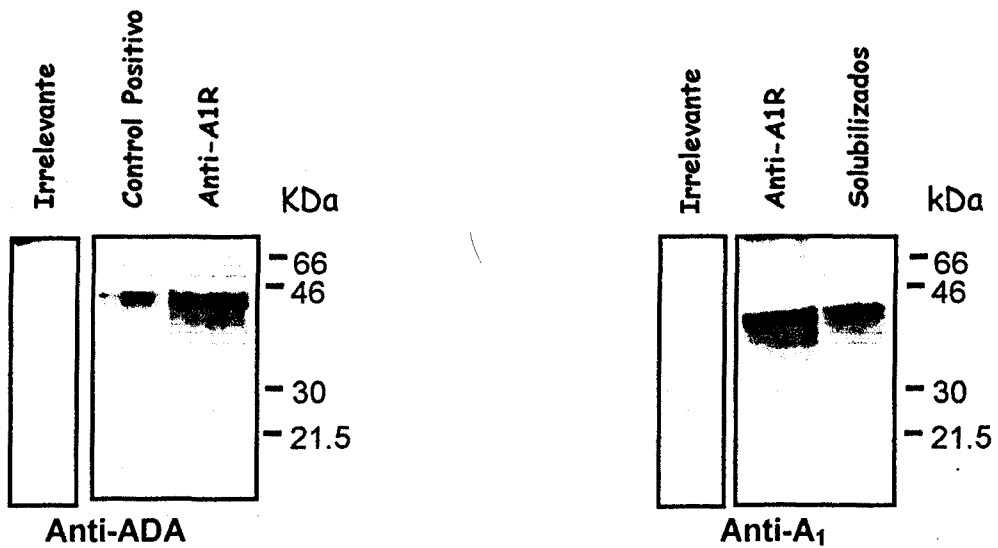


Figura 2. Coimmunoprecipitación del receptor A_1 de adenosina y la ADA. Las membranas de las células LLC-PK₁ se solubilizan tal y como se describe en materiales y métodos. Los solubilizados (1mg/ml) se incuban con un anticuerpo específico anti- A_1 R (PC11) o un anticuerpo irrelevante ambos acoplados a proteína A Sepharosa. La electroforesis y posterior wetern blot de los inmunoprecipitados revela una banda correspondiente a A_1 R y una banda correspondiente a la ADA. El control positivo corresponde a ADA bovina comercial purificada.

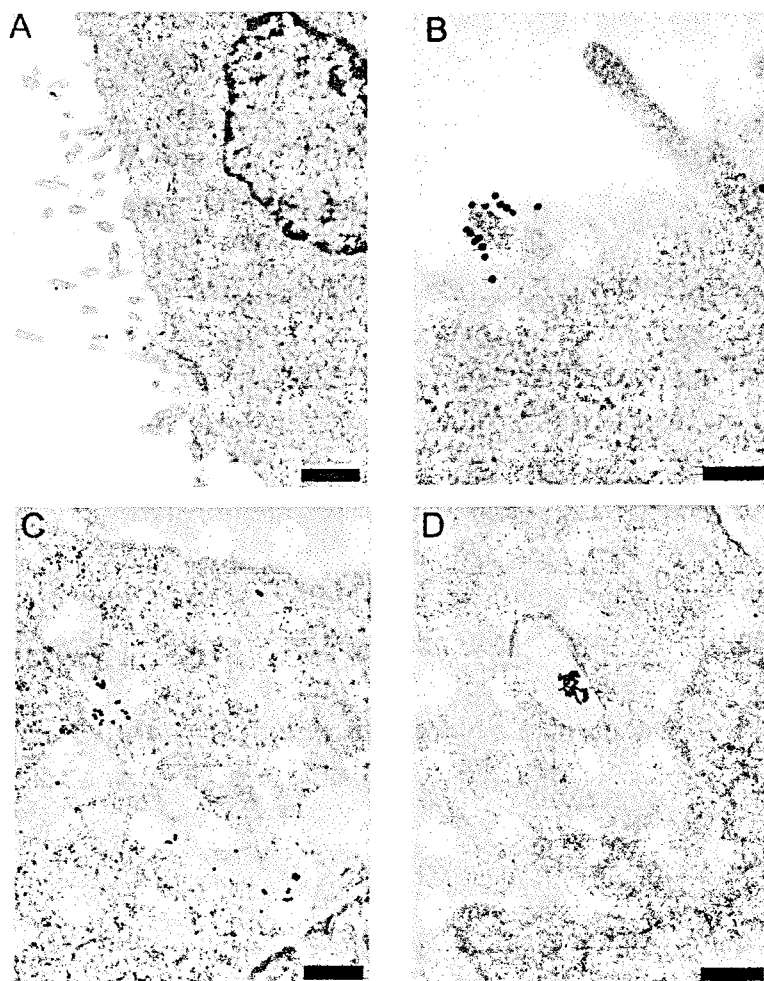


Figura 3. Estudio a nivel ultraestructural de la internalización de la ADA inducida por la activación del receptor A_1 de adenosina por R-PIA. Las células se han incubado (2h, 4°C) en DMEM-Hepes-BSA en presencia del anticuerpo anti-ADA y sin (A) o con (B, C y D) R-PIA 100nM. Las células una vez lavadas se incuban (45 min a 4°C) con proteína A-oro (20nm). Las células se lavan nuevamente con tampón frío y se incuban 15 min (B), 30 min (C) o 24 h (D) a 37°C. Las células se fijan, embeben en resina Spurr y se obtienen secciones ultrafinas que son analizadas por microscopía electrónica como se describe en Materiales y métodos. El panel A corresponde a células a 0min de internalización y no tratadas con R-PIA, no se han encontrado diferencias significativas tras 15min, 30 min o 24h de internalización. Barra de escala 0.1µm

Con el objetivo de estudiar la dinámica de internalización de la ADA tras la activación del receptor A_1 de adenosina, se ha seguido el mismo protocolo descrito para la internalización del A_1R . Las células se incuban con el anticuerpo anti-ADA (4°C, 2h) en presencia o ausencia del agonista R-PIA y

tras el lavado de las células éstas se incuban con proteína A-oro (4°C , 45 min) manteniéndose a 37°C durante 0 min, 15 min, 30 min o 24 h. El marcaje de las células LLC-PK₁ con el anticuerpo anti-ADA muestra la presencia de ADA en la superficie celular (Figura 3A). La exposición de las células al agonista, induce la translocación tiempo-dependiente de la ADA desde la superficie celular a compartimentos intracelulares. El agonista R-PIA induce tras 15 min a 37°C la agregación de la ADA en la membrana plasmática (Figura 3B), así como translocación a vesículas intracelulares (endosomas y cuerpos multivesiculares) tras 30 min (Figura 3C) y localización en posibles lisosomas tras 24 h (Figura 3D). El patrón de marcaje y la cinética de internalización de la ADA, es prácticamente idéntica a la observada para el receptor A₁ de adenosina (mirar Figura 1).

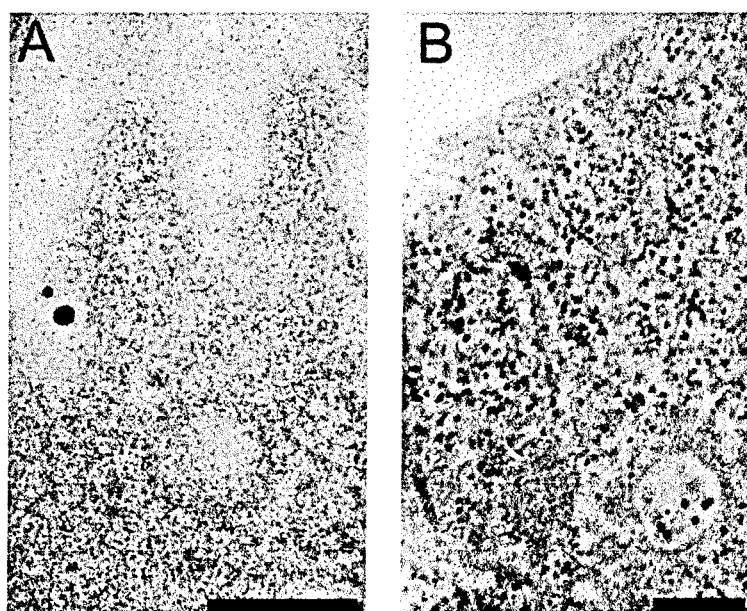


Figura 4. Colocalización de la ADA y el A₁R a nivel ultraestructural. Las células se incuban (2h, 4°C) en DMEM-Hepes-BSA en presencia del anticuerpo anti-ADA sin (A) o con (B) R-PIA 100nM. Una vez lavadas las células se incuban con proteína A-oro 10 nm ($45\text{ min } 4^{\circ}\text{C}$). Tras lavarse nuevamente las células con tampón frío, se incuban 30 min a 37°C . Las células se procesan y embeben en resinas de Lowicryl como se describe en materiales y métodos. Las secciones ultrafinas se lavan, permeabilizan y marcan con un anticuerpo anti-A₁R durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se lavan, incuban con proteína A-oro 20 nm y se analizan por microscopía electrónica. Barra de escala. $0.1\mu\text{m}$.

Los resultados descritos anteriormente sugieren que la exposición crónica de las células al agonista del receptor A_1 de adenosina R-PIA, induce de forma tiempo-dependiente la internalización conjunta del A_1R y la ADA. Para confirmar esta hipótesis se han realizado dobles marcajes de ADA y A_1R analizándose por microscopía electrónica. Las células LLC-PK₁ se incuban con el anticuerpo primario anti-ADA y como segundo anticuerpo proteína A oro (10 nm) en presencia o ausencia del agonista R-PIA. Para permitir la internalización de la ADA, las células se mantienen a 37°C durante 30 min tras los cuales las células se fijan y procesan para obtener secciones ultrafinas que son permeabilizadas y marcadas con un anticuerpo anti- A_1R y proteína A oro (20 nm). Como puede apreciarse en la figura 4A, la ADA de la superficie celular (partículas de oro de 10 nm) codistribuye con el receptor A_1 de adenosina (partículas de oro de 20 nm) en la membrana plasmática de las células LLC-PK₁. Cuando las células han sido mantenidas 30 min a 37°C, ambas proteínas translocan conjuntamente a vesículas intracelulares (Figura 4B). Estos datos nos confirman que tras la activación del receptor A_1 de adenosina por su agonista R-PIA, se induce la internalización conjunta del propio receptor y la ADA.

2- El receptor A_1 de adenosina se concentra en caveolas tras la exposición a agonistas.

Una vez establecida la cinética de internalización del receptor A_1 de adenosina y la ADA, nuestro objetivo ha sido estudiar el tipo de vesículas responsables de la internalización de ambas moléculas. Para ello mediante un método libre de detergentes hemos purificado caveolas de las células LLC-PK₁. Existen numerosos protocolos establecidos para la purificación de caveolas del conjunto de membranas celulares y proteínas citosólicas que se basan en la densidad específica de los dominios de membrana ricos en caveolas y su resistencia a la solubilización a baja temperatura en detergentes no-iónicos como el Tritón X-100 (Sargiacomo et al, 1993; Lisanti et al, 1994; Chang et al, 1994; Robbins et al, 1995; Scherer et al, 1994 and 1995; Li et al, 1995) Sin embargo recientemente, se ha sugerido que la inclusión de detergentes en los primeros pasos de la homogenización puede provocar la pérdida de algunas proteínas asociadas a caveolas como las subunidades $G_{\beta\gamma}$ (Chang et al, 1994). Por esta razón se ha usado un método libre de detergentes para la purificación de dominios ricos en caveolas. Este sistema reemplaza el Tritón X-100 por carbonato de sodio y una progresiva disrupción de las células. El lisado de las

células se ajusta al 45 % de sacarosa y se coloca en un tubo de centrífuga sobre el que se crea un gradiente de sacarosa del 5-35%. Tras una ultracentrifugación O/N, se recogen alícuotas de cada una de las fracciones y se resuelven por electroforesis y Western Blot con un anticuerpo anti-caveolina-1 y un anticuerpo anti-A₁R. La figura 5 muestra como la caveolina endógena se localiza mayoritariamente en las fracciones 3 y 4 correspondientes a las fracciones de menor densidad, mientras que el receptor aparece en más de un 90% distribuido desde la fracción 6 hasta la 9. En estas células también se ha estudiado el efecto del agonista R-PIA en la distribución del receptor A₁ de adenosina usando este mismo protocolo. Para ello las células se tratan con R-PIA 100 nM durante 30 min antes de seguir el protocolo antes descrito. En las células tratadas con R-PIA el receptor se detecta principalmente en la fracción 3 y 4 en las que la caveolina está también presente (Figura 5). Es decir, el agonista R-PIA es capaz de translocar el receptor A₁ de adenosina desde las fracciones de alta densidad (células control) a las de baja densidad (células tratadas con R-PIA) en las que también se encuentra la caveolina endógena.

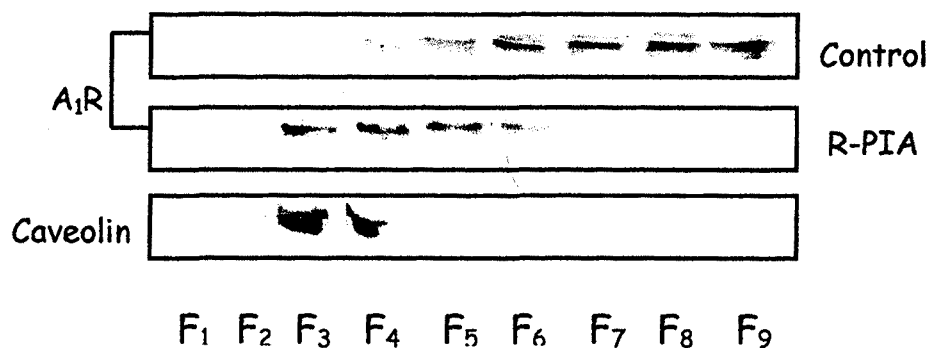


Figura 5. Western Blot de las fracciones obtenidas de las células LLC-PK₁. Las células se han incubado en ausencia (control) o presencia de 100 nM de R-PIA durante 30 min a 37°C. Las células se han lisado mediante homogenización y sonicación en un tampón de carbonato de sodio y se han sometido a ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa tal y como se describe en materiales y métodos. Cantidades iguales de proteína (10µg) de cada una de las fracciones obtenidas (F1-F9) se han resuelto mediante electroforesis (SDS-PAGE) en geles de acrilamida del 12.5 % y transferidas a membranas de PVDF. Estas membranas se han revelado con un anticuerpo anti-A₁R (PC11; 10µg/ml) o un anticuerpo anti-caveolina-1 (1:500). Las bandas se han revelado con un anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidasa seguido de un kit ECL de detección de quimioluminiscencia.

3- El receptor A_1 de adenosina y la ADA internalizan vía caveolas.

Con el fin de investigar el posible papel de las caveolas en la internalización del receptor A_1 de adenosina y la ADA, hemos realizado estudios de colocalización y análisis por microscopía confocal. Las células se han incubado en presencia del anticuerpo anti- A_1R o del anticuerpo anti-ADA conjugados ambos directamente a rodamina (PC21-TRITC y anti-ADA-TRITC respectivamente) en presencia o ausencia de R-PIA 100 nM. Tras la incubación, las células se han lavado y permeabilizado con saponina al 0.02% marcándose con el anticuerpo anti-caveolina conjugado a fluoresceína. La caveolina, aparece distribuida en la membrana plasmática delimitando el contorno celular. Un patrón similar de marcaje ha sido descrito para la caveolina-1 en fibroblastos, células modelo de expresión de caveolina (García-Cárdena et al, 1996, Smart et al, 1994, 1995). En células no tratadas con el agonista R-PIA, tanto el receptor como la ADA aparecen distribuidos de forma difusa en la superficie celular (Figura 6A y 7B). Tras 30 min a 37°C (mirar Materiales y métodos) el agonista R-PIA induce la colocalización del receptor A_1 de adenosina con la caveolina (Figura 6B). Sin embargo, tras 24 h a 37°C el receptor A_1 de adenosina presenta una distribución perinuclear con una pérdida clara de colocalización con la caveolina que muestra un marcaje exclusivo de membrana plasmática (Figura 6C). Los resultados obtenidos para la ADA y la caveolina son muy similares a los obtenidos para el A_1R . Tras 30 min ambas moléculas presentan un elevado grado de colocalización (Figura 7B) que desaparece tras 24 horas de incubación a 37°C (Figura 7C). Estos resultados nos indican que la internalización inducida por R-PIA tanto del A_1R como de la ADA ocurre vía caveolas.

Se ha descrito que la acidificación del citosol inhibe selectivamente la endocitosis vía vesículas de clatrina (Sandving et al, 1987; Tolbert et al, 1996) al impedir el ensamblamiento de la proteína a la membrana plasmática, por otro lado la filipina, un antibiótico que por sus características se une a los esteroides como el colesterol, impide, por este motivo, la estructuración de las caveolas (Schnitzer et al, 1994). Para confirmar si la internalización del receptor inducida por R-PIA ocurre vía caveolas, las células LLC-PK₁ se han pretratado con ácido acético 5mM durante 5 min o con filipina 5µg/ml durante 30 min a 37°C antes del tratamiento con R-PIA 100 nM. Tras 30 min de incubación con el agonista R-PIA, las células presentan un marcaje punteado, intracelular, correspondiente al receptor internalizado (Figura 8B), en contraste en las células previamente tratadas con filipina, no se aprecia ningún marcaje indicando que ante la disrupción de las caveolas por la filipina el receptor no ha

podido ser internalizado (Figura 8C). El tratamiento con ácido acético, no es capaz de inhibir la internalización del receptor A_1 de adenosina observándose un marcaje muy parecido al de las células tan sólo tratadas con el agonista (Figura 8D). El hecho de que la filipina y no el ácido acético sea capaz de bloquear la internalización del receptor A_1 de adenosina, es un evidencia más de que las caveolas y no las vesículas de clatrina están implicadas en la internalización del A_1R .

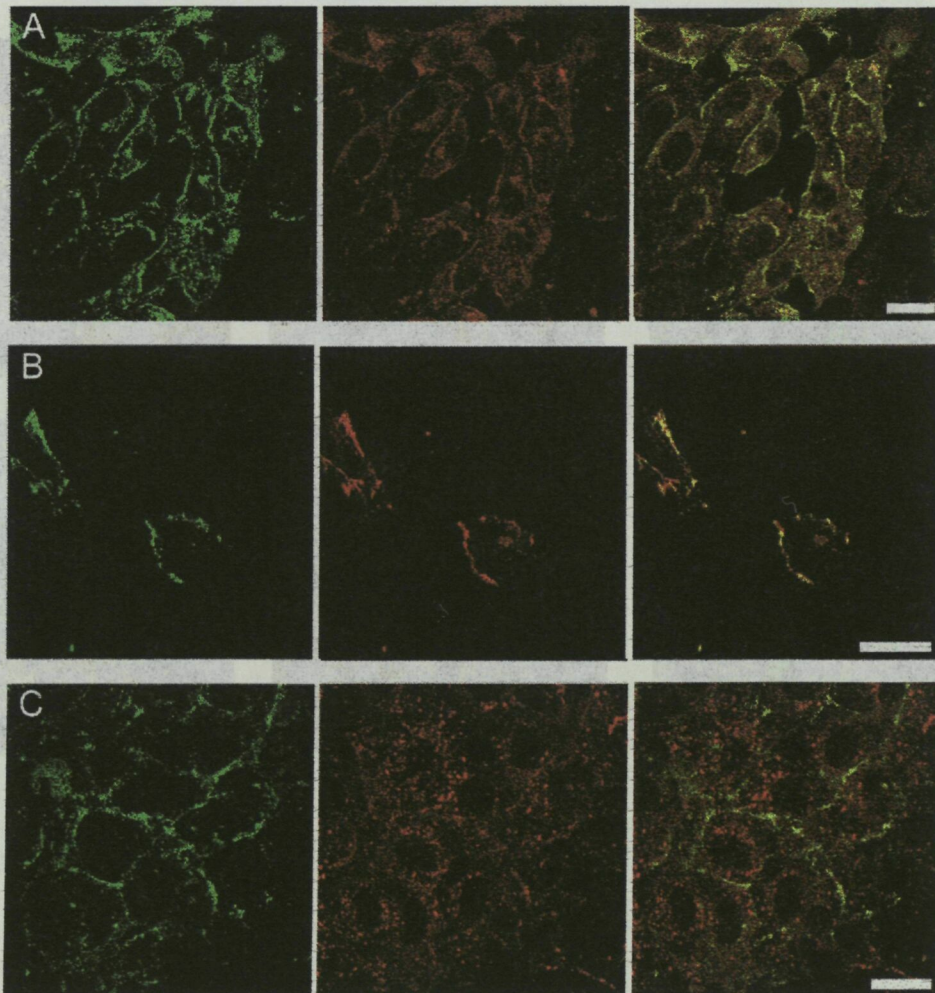


Figura 6. Colocalización del A_1R y la caveolina. Colocalización de la ADA y la caveolina. Las células se incuban (2h, $4^{\circ}C$) en DMEM que contiene el anticuerpo anti-ADA ($10\mu g/ml$) conjugado directamente a rodamina (rojo) en ausencia (A) o presencia (B y C) de R-PIA $100\ nM$. Tras un lavado, las células se incuban 0 min (A), 30 min (B) o 24 h (C) a $37^{\circ}C$. Las células se lavan nuevamente, se fijan, permeabilizan y marcan con un anticuerpo anti-caveolina conjugado directamente a fluoresceína (verde). Las muestras se analizan por microscopía confocal. La colocalización se muestra en amarillo. La imagen corresponde a una sección media horizontal de la célula. Barra de escala $10\mu m$.

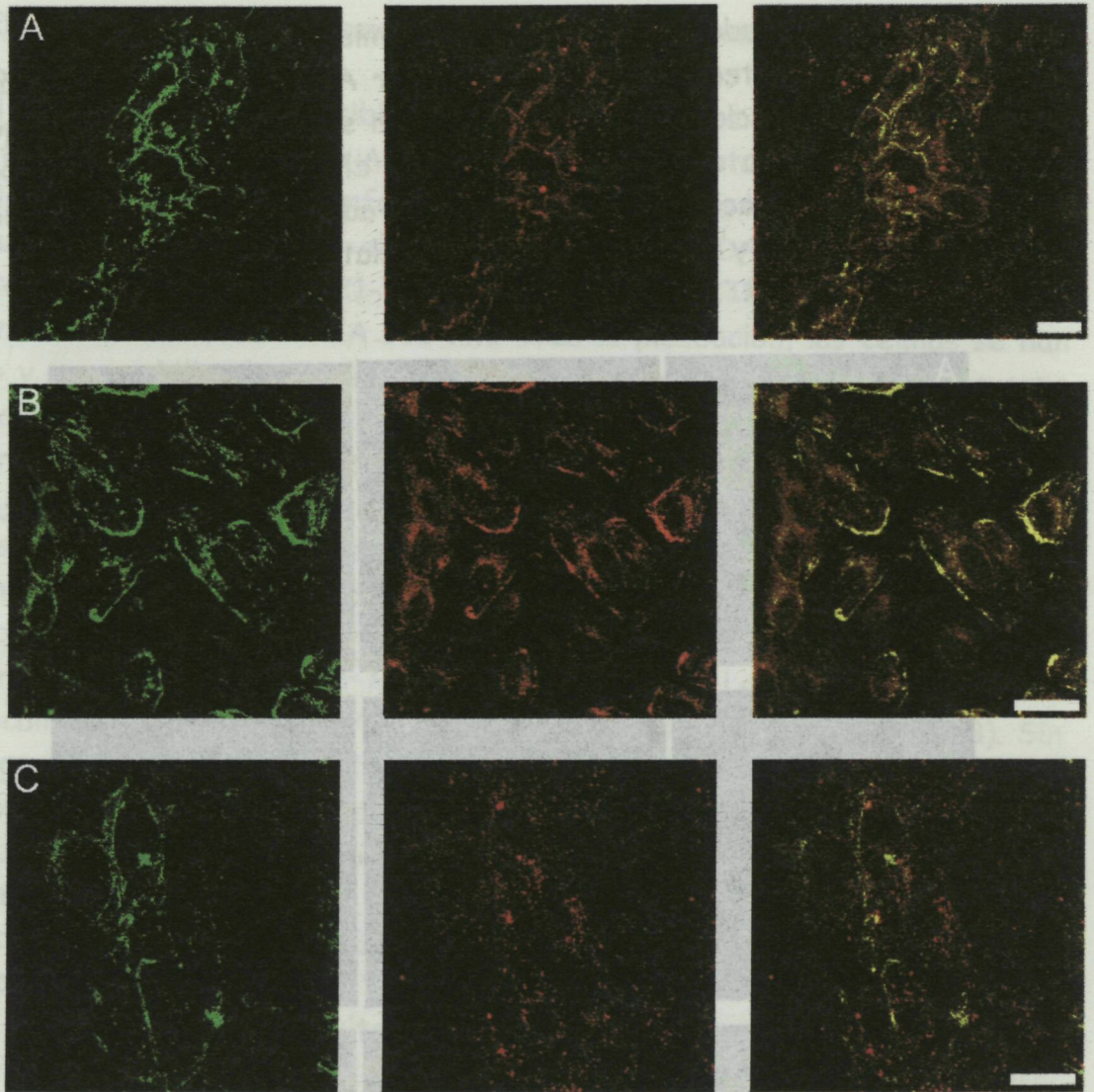


Figura 7. Colocalización de la ADA y la caveolina. Las células se incuban (2h, 4°C) en DMEM que contiene el anticuerpo anti-ADA (10µg/ml) conjugado directamente a rodamina (rojo) en ausencia (A) o presencia (B y C) de R-PIA 100 nM. Tras un lavado, las células se incuban 0 min (A), 30 min (B) o 24 h (C) a 37°C. Las células se lavan nuevamente, se fijan, permeabilizan y marcan con un anticuerpo anti-caveolina conjugado directamente a fluoresceína (verde). Las muestras se analizan por microscopía confocal. La colocalización se muestra en amarillo. La imagen corresponde a una sección media horizontal de la célula. Barra de escala 10µm.

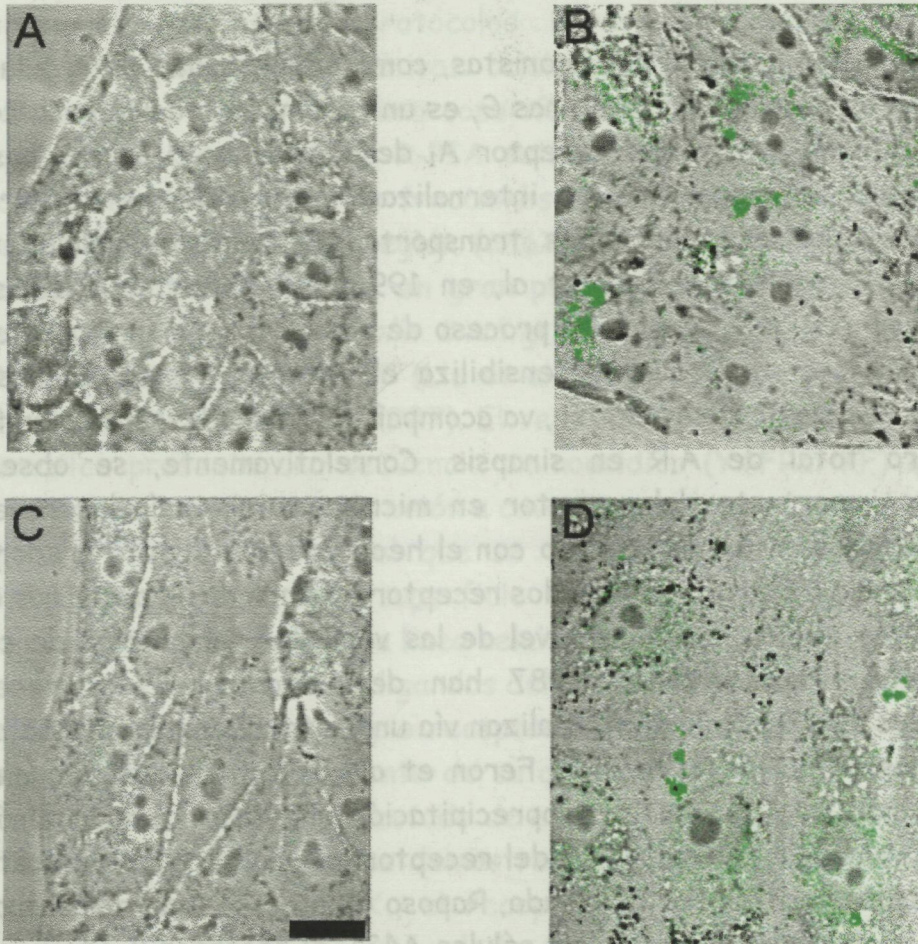


Figura 8. Efecto de los tratamientos con filipina y ácido acético en la internalización del A1R. Las células se tratan sin (A y B) o con filipina 5µg/ml (C) durante 30 min o 5mM de ácido acético (D) durante 5 min tras lo cual las células se incuban con anticuerpo anti-A1R (10µg/ml, 4°C, 2h) en ausencia (A) o presencia (B, C y D) de R-PTA 100nM. Las células se procesan y analizan por microscopía confocal tal y como se describe en Materiales y métodos. La imagen corresponde a una superposición de una sección media de la célula marcada con fluoresceína (verde; receptor internalizado) y contraste de fases. Barra de escala 10µm.

DISCUSIÓN.

La internalización inducida por agonistas, como un mecanismo de regulación de los receptores acoplados a proteínas G, es un fenómeno todavía poco conocido especialmente en el caso del receptor A_1 de adenosina. El primer paso para conocer mejor el mecanismo de internalización del A_1R , es definir la vía mediante la cual el receptor es transportado al interior celular tras la activación por agonistas. Ruiz et al, en 1996 estudiaron el mecanismo de internalización del A_1R durante su proceso de desensibilización. El tratamiento crónico de ratas con R-PIA desensibiliza el receptor A_1 de adenosina. La pérdida de respuesta del receptor, va acompañada de un descenso significativo del número total de A_1R en sinapsis. Correlativamente, se observa un incremento importante del receptor en microsomas y vesículas revestidas. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que la ruta predominante descrita para la internalización de los receptores acoplados a proteínas G, es la vía endocítica clásica iniciada a nivel de las vesículas recubiertas de clatrina. Sin embargo, Raposo et al, 1987 han demostrado que los receptores muscarínicos de acetilcolina internalizan vía una ruta independiente de clatrina en fibroblastos humanos. Además Feron et al, 1997, han descrito mediante centrifugación isopícnica e inmunoprecipitación una translocación dinámica a caveolas estimulada por agonistas del receptor m_2 muscarínico de acetilcolina en miocitos de corazón. Por otro lado, Raposo et al, 1989 han demostrado por microscopía electrónica, que en las células A431, el receptor β -adrenérgico se internaliza de forma preferente vía vesículas no revestidas. En estos experimentos, las vesículas revestidas nunca aparecen marcadas con partículas de oro sugiriendo que el receptor β -adrenérgico está excluido de estas estructuras. Cabe tener en cuenta que en estas células la ruta dependiente de vesículas de clatrina es funcional, ya que el receptor de la transferrina es endocitado vía dichas vesículas (Daukas et al, 1985). En otras líneas celulares o en células transfectadas, la internalización del receptor muscarínico o del receptor β -adrenérgico sigue la ruta clásica en la que intervienen las vesículas de clatrina (Tolbert and Lamah, 1996; Zastrow and Kobilka, 1992).

Tras el tratamiento con R-PIA, las células LLC-PK₁ muestran un elevado grado de colocalización entre el A_1R y la caveolina en vesículas intracelulares. Además, la internalización del receptor se bloquea tras el tratamiento con filipina que inhibe la formación de caveolas pero no con ácido acético que evita la internalización vía vesículas de clatrina. Estos resultados, aportan indirectamente evidencias de que la internalización del A_1R ocurre vía caveolas.

La localización del receptor en estas estructuras se ve a su vez confirmada por análisis bioquímicos usando protocolos libres de detergentes para la purificación de caveolas de cultivos celulares. Utilizando estos protocolos hemos demostrado que la caveolina copurifica con el A₁R tras el tratamiento con agonistas. De este modo la R-PIA estimula la acumulación de parte del receptor A₁ de adenosina en las fracciones ricas en caveolas. Recientemente Couet et al, han definido una región (ϕXϕXXXX y ϕXXXXϕXXϕ, siendo ϕ un aminoácido aromático) presente en gran parte de las proteínas asociadas a caveolas. Estos dominios (*caveolin binding motifs*) se han encontrado en el receptor EGF, PDGF, FGF y NGF (Liu et al, 1996; Mineo et al, 1996; Corley-Mastick et al, 1995; Wu et al, 1997). El receptor A₁ de adenosina en su cola citoplasmática presenta una secuencia aminoacídica (YAFRIHKF) que podría comportarse como un dominio de unión a caveolina.

El grupo de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral, ha demostrado que la ADA de la superficie celular interacciona con el A₁R en corteza cerebral de cerdo y en la línea celular DDT₁MF-2 y que este enzima es capaz de modular la unión de los ligandos del receptor A₁ de adenosina así como la señalización a través del propio receptor (Ciruela et al, 1996; Saura et al, 1998). De una forma independiente de su actividad catalítica, la ADA parece ser necesaria para conseguir el estado de alta afinidad del receptor (Saura et al, 1997) En este trabajo, hemos demostrado mediante coimmunoprecipitación que en la línea epitelial LLC-PK₁, el receptor A₁ de adenosina se comporta también como una proteína de unión de la ADA, permitiéndolo el anclaje en la membrana plasmática. Además la ADA de superficie sufre una internalización inducida por el agonista adenosínico R-PIA. La ADA internalizada se localiza en vesículas intracelulares donde también colocaliza el receptor A₁ de adenosina.

La microscopía electrónica y confocal que hemos presentado en este trabajo, demuestra que la ruta endocítica descrita para la internalización inducida por R-PIA del receptor y la ADA se inicia en las caveolas. Este hecho constituye un avance importante en la comprensión de los mecanismos implicados en la endocitosis de los receptores acoplados a proteína G. Los resultados aquí presentados juntamente con los ya descritos en la literatura sugieren que el modo en el que se compartimentalizan los receptores tras la estimulación por agonistas depende tanto del subtipo de receptor como del sistema celular en el que se exprese.

